



Proceedings and Abstracts

งานประชุมวิชาการประจำปี
สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
ครั้งที่ 39

18-19
พฤษภาคม
2560

โรงแรมบางแสนเออริทจ บางแสน ชลบุรี

วันที่ 20 พฤษภาคม 2560

Workshop: Zebrafish in Experimental Pharmacology

ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Illustrious Issues in Pharmacology

Proceedings & Abstracts

Of the 39th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting

18 - 20 May 2017

“Illustrious Issues of Pharmacology”

Organized by

The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University

Production Editors

Pattaravadee Srikoon

Cover Design

Wisarut Puangkaew

สารบัญ

สารจากอธิการบดีมหาวิทยาลัยบูรพา	i
สารจากนายกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย	ii
สารจากคณบดีคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	iv
คณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการ	v
คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิประเมินผลงาน	vi
กำหนดการ	viii
เอกสารประกอบการบรรยาย	
ปาฐกถาเกียรติยศ รองศาสตราจารย์ ดร. จีรวัดก์ สดawangศ์วิวัฒน์ Redox Signaling: from Life to Death Prof. Veerapol Kukongviriyapan, Ph.D.	1
Quantitative Systems Pharmacology: New approaches to drug discovery and stratified medicine Somponnat Sampattavanich, Ph.D.	2
Advancement of precision medicine in cancer Asst. Prof. Suphat Subongkot, BCP, BCOP	3
Systems biology approach to precision medicine Trairak Pisitkun, M.D., Ph.D	4
Engineered synthetic antibody for cancer detection and treatment Asst. Prof. Peti Thuwajit, M.D., Ph.D.	5
NK cell-based immunotherapy in viral infection and its clinical approach Pattaravadee Srikoon, Ph.D.	6
แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย นายแพทย์สุเทพ วิชรปิยานันทน์	7
Renieramycin Alkaloids from the Thai Blue Sponge, Xestospongia sp. as New Anticancer Agents Khanit Suwanborirux, Ph.D.	9
Pharmacokinetics of Herbal Extracts: A Case Study of ECa233 Asst. Prof. Phisit Khemawoot1, Ph.D.	10
Molecular Regulation of Cancer Stem cell in Lung Cancer Assoc. Prof. Pithi Chanvorachote, Ph.D.	11
The ER membrane-located RMA1 E3 ligase complex is involved in ERQC autophagy and priming stressed cells to apoptosis	12

Pattarawut Sopha, Ph.D.

Update on In vitro Models in Nanotechnology and Drug Development Research 13

Sasitorn Aueviriyavit, Ph.D.

Nanoparticle based- drug delivery system for current targeted therapy 14

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์

Proceeding

B02	Urinary Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-6 in Lupus Nephritis Responders: A Preliminary Study	15
B04	Combination Effect of Cepharanthine and 5-Fluorouracil on Human Colon Cancer in a Mouse Xenograft Model	25
B06	Standardized Extract of <i>Centella asiatica</i> ECa 233 Decreased ROS Production in LPS-Induced Skin Keratinocyte and Macrophage Cells	35
B07	Anticancer Effects of Piperine-Free Piper Nigrum Extract on Cholangiocarcinoma Cells	47
B08	Iron Distribution and Iron Deposition in the Bone of β -Thalassemic Mice and a Preliminary Study of the Effect of Iron Chelator Deferiprone	58
B10	Protective Effects of Cyanidin-3-Rutinoside Against Formation of Insulin Fibrillation	66
B12	Metformin Induced Cytotoxicity in Cervical Cancer Cell Line	77
B13	High Oxidative Stress and PDGF-BB Levels in Thalassemia Patients Negatively Affect Cultured Endothelial Cells: A Preliminary Study	84
B14	Absolute Oral Bioavailability and Disposition Kinetics of Puerarin in Female Rats	94
B15	Quantitative Determination of Colistin in Human Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection for Therapeutic Drug Monitoring	110
B16	Metformin Increases MRP2 Activity in MCF-7 Breast Cancer Cells after Prolonged Treatment	121
B17	Role of NOX on Intracellular Reactive Oxygen Species and Platelet Activity in β -Thalassemia/Hemoglobin E	129
B18	Nitric Oxide (NO) Metabolites and Expression of Genes Associated with NO production in Breast Cancer Tissues from Patients	138
B19	Effect of Pomelo on Mdr1a, Mdr1b and Slc21a5 Expressions in Rats	145
B20	Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts of Plant from Sa-Tri-Lhang-Klod Remedy for Postpartum Infection	153
B21	The Effect of Monosodium Glutamate on Sex Ratio and Reproductive Organ of Zebra Fish	163

B22	Association of ABCB1 C3435T Polymorphism with Clinical Outcome of Risperidone in Thai Patients with Schizophrenia	175
B23	Association of Phenytoin Maintenance Dose and Severe Cutaneous Adverse Drug Reactions in Thai Patients	184

Abstract

A01	Rimantadine is More Toxic than Amantadine on Human Astrocytes and Human Neurons	199
A02	The in vitro Antimalarial Activities of <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.	200
A03	Pharmacological Evidence of EDHF-Mediated Vasorelaxation in Response to <i>Moringa Oleifera</i> Leaf Extract in L-NAME Induced Hypertensive Rats	201
A04	Cysteinyl Leukotriene Receptor Antagonists Suppress the Growth and Induce Cell Death in Human Glioblastoma	202
A05	Cytotoxicity and Apoptosis Inducing Effect of Plumbagin on Cholangiocarcinoma Cell	203
A06	Study on Anticancer Activity of Ethyl-p-Methoxycinnamate to Cholangiocarcinoma	204
A07	Antiviral and Anti-inflammatory Effects of α -Mangostin from <i>Garcinia mangostana</i> Linn. in Dengue Virus Infection	205
A08	Phytochemical Properties, Acute and Subacute Oral Toxicity of Crude Water Soluble Extract of <i>Tradescantia fluminensis</i> in Wistar Rats	206
A09	The Effect of Pomelo Juice and Methanolic Extract on Lipid Peroxidation in Platelet Suspensions	207
A10	Cytotoxic, Apoptotic and Inhibitory Activities on Cell Migration of Atractylodin in Cholangiocarcinoma Cell Line	208
A11	Atractylodin from <i>Atractylodes Lancea</i> Induces Apoptosis and Inhibits Growth of Human Cholangiocarcinoma Cells	209
A12	Anticholangiocarcinoma and Toxicity Evaluation of <i>Kaempferia galanga</i> L. Rhizome Extract	210
A13	Cytotoxic Activities and Effects of β -Eudesmol against Cholangiocarcinoma Cell Line	211
A14	Antiproliferative Effects of Oxepin-Annulated Coumarins on Human Cancer Cell Lines	212
A15	Mutagenic and Apoptotic Activities of Ethanolic Extract and Bioactive Components of <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC. in Cholangiocarcinoma Cell Lines	213
A16	<i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC. Drug Development for Treatment of Bile Duct Cancer	214
A17	Antimalarial Activity of Isolated Compounds from <i>Stephania venosa</i>	216
A18	Effect of β 2-Adrenergic Receptor (β 2-AR) Agonists on β 2-AR-Mediated	217

	Inhibition of Insulin-Induced GLUT4 Translocation and GLUT4 mRNA Expression	
A19	Inhaled Nebulized Sodium Nitrite Showed No Effect on Lipid Peroxidation in Hemoglobin E/ β -Thalassemia Patients: A Preliminary Result	218
A20	Deferiprone Increases Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cells	219
A21	Metformin Sensitizes Cholangiocarcinoma Cells to Cytotoxic, Antiproliferative and Antimigratory Activities of Cisplatin	220
A22	Anti-inflammatory Activity of Methanol Extract and Lignans from <i>Mitrephora sirikitiae</i> Leaves in RAW264.7 Cells	221
A23	The Effects of Ethanol Extract of <i>Boesenbergia rotunda</i> Rhizomes on Learning and Spatial Memory and Hippocampal Cell Death after Common Carotid Artery Occlusion in Mice: A Preliminary study	222
A24	Induction of Intestinal Efflux Transporters and Pharmacokinetic Alterations after Multiple Oral Dosing of Standardized Extract of <i>Centella asiatica</i> ECa 233 in Rats	223
A25	Effects of Deoxycholic Acid in Curcumin-Formulated Liposomes on Apoptosis Induction via Caspase 3/7 Activation Pathway in Cholangiocarcinoma Cell Lines	224
A26	Effects of Cyclopamine on Cell Viability, Cell Invasion, and 5-Fluorouracil Anticancer Activity in SW-620 Colorectal Cancer Cells	225
A27	The Prevalence of Hemoglobin Type in Malaria Susceptibility and Severity	226
A28	<i>Careya sphaerica</i> Roxb. Protected SH-SY5Y Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Cell Death	227
A29	Inhibitory Effect of <i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb. and Oxyresveratrol on Alpha-Glucosidase	228
A30	Hypocholesterolemic Effect of Sericin-Derived Oligopeptides in High-Cholesterol Fed Rats	229
A31	Anti-adipogenesis Effect and Molecular Mechanism of <i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb. and oxyresveratrol in Culture Adipocytes	230
A32	Neuroprotective Activity of <i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb. Extract and Oxyresveratrol	231
A33	Preparation of <i>Gynura pseudochina</i> DC. var. <i>hispida</i> Thv. Extract Ointment for Subacute Toxicity Test Before Clinical Trial Against Psoriasis Plaque	232
A34	Effect of Aril Extract of <i>Momordica cochinchinensis</i> Spreng on Glucose and Fat Metabolism in High Fat and High Fructose Diet Induced Insulin Resistant Rats	233
A35	The Neuroprotective Effects of a Germinated Black Glutinous Rice Diet on A β 25-35 Peptide Induced Learning and Memory Deficits in Male Rats	234

สารจากอธิการบดีมหาวิทยาลัยบูรพา

ในโอกาสที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาได้รับเกียรติเป็นเจ้าภาพร่วมกับสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ดำเนินการจัดการประชุมวิชาการประจำปี พ.ศ. 2560 ในหัวข้อ Illustrious Issues in Pharmacology 2017 ณ ศูนย์ประชุมบางแสนเฮอริเทจ บางแสน จ.ชลบุรี ในวันที่ 18 - 19 พฤษภาคม 2560 และการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง Zebrafish in Experimental Pharmacology ในวันที่ 20 พฤษภาคม 2560 ณ คณะเภสัชศาสตร์ แล้วนั้น มหาวิทยาลัยบูรพาขอแสดงความชื่นชมยินดีต่อความสำเร็จของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ที่ได้มีการจัดประชุมวิชาการ เพื่อนำเสนอวิทยาการใหม่ ๆ ในสาขาวิชาเภสัชวิทยาและศาสตร์ที่เกี่ยวข้องได้อย่างต่อเนื่องจนเป็นการประชุมครั้งที่ 39 ในวันนี้ มหาวิทยาลัยบูรพารู้สึกเป็นเกียรติที่ได้มีโอกาสเข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของความสำเร็จดังกล่าว และขอถือโอกาสนี้ขอบคุณหน่วยงาน คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ได้ให้ร่วมแรงร่วมใจจัดการประชุมในครั้งนี้ให้สำเร็จลงด้วยดี

ในฐานะเจ้าของบ้าน มหาวิทยาลัยบูรพาขอต้อนรับท่านวิทยากร นักเภสัชวิทยา นักวิจัย และผู้เข้าร่วมประชุมจากสถาบันการศึกษา และหน่วยงานต่าง ๆ ทั่วประเทศ รวมทั้งท่านผู้มีเกียรติทุกท่านในนี้ด้วยความยินดี ขอให้ทุกท่านได้รับความรู้ และความประทับใจจากการเข้าร่วมงานประชุม มีความสุขเพลิดเพลินกับอาหาร และทัศนียภาพที่สวยงามของชายหาดบางแสน และหวังว่ามหาวิทยาลัยบูรพา คงได้มีโอกาสต้อนรับท่านอีกครั้งในโอกาสต่อไป ขออวยพรให้การประชุมครั้งนี้ บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ทุกประการ และขอเปิดการประชุม ณ บัดนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.สมนึก อีระกุลพิศุทธิ์
ผู้ปฏิบัติหน้าที่อธิการบดีมหาวิทยาลัยบูรพา

สารจากนายกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

กระผม รองศาสตราจารย์ นพ. สุพรชัย กองพัฒนากุล ในนามนายกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ขอกราบขอบพระคุณท่านอธิการบดีที่ได้กรุณาให้เกียรติมาเป็นประธานในพิธีเปิดการประชุมวิชาการในวันนี้ สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย มีกำหนดจัดการประชุมวิชาการเป็นประจำทุกปีติดต่อกัน โดยหมุนเวียนให้สถาบันต่างๆ เป็นเจ้าภาพจัดการประชุมร่วมกับสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยซึ่งในการประชุมครั้งที่ 39 นี้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้รับเป็นผู้จัดการประชุมวิชาการของสมาคมเภสัชวิทยา ในหัวข้อของ Illustrious Issues in Pharmacology 2017 ณ ศูนย์ประชุมบางแสน เฮอริเทจ บางแสน จ.ชลบุรีในวันที่ 18-19 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 และการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Zebrafish in Experimental Pharmacology ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 นี้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ของการประชุมดังนี้

1. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ติดตามความก้าวหน้าของวิทยาการใหม่ๆในด้านเภสัชวิทยาและศาสตร์อื่นที่เกี่ยวข้องแก่ผู้เข้าร่วมประชุม
2. แลกเปลี่ยนความคิดเห็น ประสบการณ์ และแสวงหาความร่วมมือในการทำงานวิจัยของผู้เข้าร่วมประชุม
3. เป็นเวทีนำเสนอผลงานวิจัยของอาจารย์นักวิจัยและนิสิตนักศึกษาในสาขาวิชานี้และวิทยาศาสตร์สุขภาพอื่นๆ
4. เรียนรู้และฝึกฝนการใช้ปลาหมักลาย (Zebrafish) เป็นสัตว์ทดลอง

ทั้งนี้ รูปแบบของการประชุมประกอบด้วยการบรรยายโดยวิทยากรผู้ทรงคุณวุฒิจากหน่วยงานต่างๆ การนำเสนองานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ซึ่งจะมีบางส่วนที่ได้รับพิจารณาให้ตีพิมพ์ในรูปแบบบทความวิจัยในวารสารเภสัชวิทยาซึ่งเป็นวารสารที่อยู่ใน TCI หรือใน Proceedings ของการประชุมหรือเผยแพร่ในรูปแบบของบทความย่อโดยจะมีการประกวดและมอบรางวัลแก่ผลงานโปสเตอร์ดีเด่น การชมนิทรรศการเครื่องมือวิจัยและการประชุมเชิงปฏิบัติการโดยมีผู้เข้าร่วมประชุมที่เป็นสมาชิกของสมาคมเภสัชวิทยาฯและผู้ที่สนใจ จาก 18 สถาบันการศึกษา 35 หน่วยงาน และมีผลงานที่นำเสนอกว่า 50 ผลงาน ทั้งยังได้จัดให้มีการบรรยายพิเศษเพื่อรำลึกถึงนักเภสัชวิทยาผู้มีคุณูปการต่อวงการเภสัชวิทยาของประเทศไทยคือ รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดก์ สดาวงค์วิวัฒน์ ในหัวข้อ Redox signaling: from Life to Death และจะมีการมอบรางวัลเกียรติยศศาสตราจารย์ นพ.อวย เกตุสิงห์ ประจำปี 2560 ด้านผลงานวิจัยดีเด่นด้านเภสัชวิทยาในการประชุมครั้งนี้

การประชุมนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความร่วมมือจากคณาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยากร บริษัทต่าง ๆ ผู้ให้การสนับสนุนการประชุม บุคลากร นิสิต รวมทั้งผู้เข้าร่วมประชุมทุกท่าน กระผมจึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ บัดนี้ ได้เวลาอันสมควร กระผมขอกราบเรียนเชิญท่านอธิการบดีกล่าวเปิดการประชุมในครั้งนี้

รองศาสตราจารย์ นพ.สุพรชัย กองพัฒนากุล
นายกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

สารจากคณบดีคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ในนามของคณะเภสัชศาสตร์ กระผมรู้สึกเป็นเกียรติเป็นอย่างยิ่งที่ได้มีโอกาสต้อนรับผู้เข้าร่วมประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 39 ของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ซึ่งจัดขึ้นในระหว่างวันที่ 18 – 20 พฤษภาคม 2560 ณ ศูนย์การประชุมบางแสนเฮอริเทจ จังหวัดชลบุรี และอาคารปฏิบัติการเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ครั้งนี้ นับเป็นครั้งแรกที่สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยได้มีการจัดการประชุมวิชาการประจำปีขึ้น ที่บางแสน จ.ชลบุรี โดยมีคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาได้รับเกียรติเป็นเจ้าภาพร่วม จึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าท่านผู้เข้าร่วมประชุมทุกท่านจะได้รับทั้งความรู้จากการประชุมวิชาการและความประทับใจจากความอุดมสมบูรณ์ของสวนผลไม้และทัศนียภาพของฝั่งทะเลตะวันออก

ในโอกาสนี้ กระผมใคร่จะขอขอบพระคุณ วิทยากรทุกท่านที่ได้ให้เกียรติมาบรรยายและสาธิตการทดลอง คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ คณะกรรมการพิจารณาผลงานและโปสเตอร์ คณะกรรมการอำนวยการ คณะกรรมการดำเนินการจัดการประชุม นิสิตและเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน บริษัทห้างร้านที่เข้าร่วมแสดงนิทรรศการเครื่องมือหรือให้การสนับสนุนในรูปแบบอื่น ตลอดจนความร่วมมือจากสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยและมหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเป็นส่วนสำคัญทำให้การจัดการประชุมครั้งนี้ลุล่วงไปด้วยดี หวังว่าคณะเภสัชศาสตร์คงจะได้มีโอกาสต้อนรับทุกท่านอีก

เภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร.เอกรินทร์ สายฟ้า
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

คณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการ (Organizing Committee)

การประชุมวิชาการครั้งที่ 39 สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
โดย สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ร่วมกับ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

เภสัชกร พลตรีสุนันท์ โรจนวิภาต
เภสัชกร ศาสตราจารย์ ดร.สมพล ประคองพันธ์
เภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร.เอกรินทร์ สายฟ้า
ศาสตราจารย์ ดร.เกศรา ณ บางช้าง
รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สุพรชัย กองพัฒนากุล

คณะกรรมการอำนวยการ

เภสัชกรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติศิระ	ประธาน
เภสัชกรหญิง ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ	รองประธาน
เภสัชกรหญิง ดร.ณัฐฉิณี ธีรกุลกิตติพงศ์	กรรมการ
เภสัชกร อาจารย์ธรรชาติ ศรีจันทร์	กรรมการ
ดร.อนุสรณ์ ธรรมพิทักษ์	กรรมการ
อาจารย์วนิดา โอฟารกิจอนันต์	กรรมการ
อาจารย์ทศพล จิระสมประเสริฐ	กรรมการ
อาจารย์ภักดี สุขพรสวรรค์	กรรมการ
อาจารย์สุวิศิษฐ์ แม้นเหมือน	กรรมการ
อาจารย์ภัรดา บุญเพื่อน	กรรมการ
อาจารย์ทองแสง วีร์กุล	กรรมการ
อาจารย์จิตติมา เกษมสุข	กรรมการ

คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิประเมินผลงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เภสัชกรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ เจียรณมงคล
อาจารย์ ดร. แพทย์หญิงปาจรีย์ จรรย์วิลาศกุล
อาจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์

มหาวิทยาลัยมหิดล

เภสัชกรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์
เภสัชกรหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิลาสินี หิรัญพาณิชย์ ซาโตะ
เภสัชกรหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรพรรณ วิวัฒนาภรณ์
รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ประวิทย์ อัครเสรินนท์
รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงอุไรวรรณ พานิช

มหาวิทยาลัยนเรศวร

เภสัชกรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.รัตติมา จีนาพงษา
เภสัชกรหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรรถัน โลहितนาวิ
เภสัชกร อาจารย์ ดร.ขวัญชัย รัตนมณี
เภสัชกร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฏฐิ์ แซ่ลิ้ม
เภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร.มนุพัศ โลहितนาวิ
เภสัชกร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนศักดิ์ เทียกทอง

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เภสัชกร ศาสตราจารย์ ดร.วีรพล คู่คงวิริยะพันธุ์
เภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา สัตยาชัย
รองศาสตราจารย์ ดร.พัชรวิทย์ ปั่นหนองเพ็ชร

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศาสตราจารย์ ดร.เกศรา ณ บางช้าง

มหาวิทยาลัยอีสเทิร์น

เภสัชกรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พล.ต.หญิง นิสามณี สัตยาบัน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยชาญ แสงดี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อาจารย์ ดร.สมชาย ศรีวิริยะจันทร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

เภสัชกรหญิง ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ
อาจารย์ ดร.อนุสรณ์ ธรรมพิทักษ์

กำหนดการ

การประชุมวิชาการครั้งที่ 39 สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

“Illustrious Issues in Pharmacology”

วันที่ 18 - 20 พฤษภาคม 2560

ณ ศูนย์ประชุมบางแสนเฮอริเทจ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี

วันที่ 1: วันพฤหัสบดีที่ 18 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 (ณ ศูนย์ประชุมบางแสนเฮอริเทจ)

8:00-8:45	ลงทะเบียน
8:45-9:00	กล่าวต้อนรับ โดย คณบดีคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
9:00-9:15	กล่าวรายงานการประชุม โดยนายกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
9:15-9:30	พิธีเปิด โดยอธิการบดีมหาวิทยาลัยบูรพา
9:30-10:30	ปาฐกถาเกียรติยศ รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดก์ สดาวงค์วิวัฒน์ Redox signaling: from Life to Death เภสัชกร ศาสตราจารย์ ดร.วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
10:30-11:00	รับประทานอาหารว่าง
11:00-12:00	Quantitative Systems Pharmacology: New approaches to drug discovery and stratified medicine อาจารย์ ดร.สมพลนาท สัมปัตตะวนิช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล
12:00-13:00	Lunch symposium Long Term Effectiveness of DSS in Schizophrenia นายแพทย์นิพัทธ์ กาญจนธนาเลิศ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
13:00-13.45	Advancement of precision medicine in cancer เภสัชกร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภัทสรณ์ สุขงกช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
13:45-14:30	System biology approach to precision medicine อาจารย์ ดร. นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
14:30-15:00	รับประทานอาหารว่าง การนำเสนอผลงานวิชาการแบบโปสเตอร์ ประชุมธุรการสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย (เฉพาะสมาชิก)

15.00-15.45	Engineered synthetic antibody for cancer detection and treatment ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ปิติ ฐวจิตต์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
15.45-16.30	NK cell-based immunotherapy in viral infection and its clinical approach เภสัชกรหญิง ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
16.30-18.00	พักผ่อนตามอัธยาศัย
18.00-21.00	งานเลี้ยงต้อนรับ

วันที่ 2: ศุกร์ที่ 19 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 (ณ ศูนย์ประชุมบางแสนเฮอริเทจ)

8:30-9:00	ลงทะเบียน
9:00-10:00	การบรรยายพิเศษ” แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย นายแพทย์สุเทพ วัชรปยานันท์ อธิบดีกรมการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข
10:00-10:45	Renieramycin alkaloids from the Thai Sponge Xestospongia sp. as new anticancer agents เภสัชกร ดร.คณิต สุวรรณบริรักษ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10:45-11:00	รับประทานอาหารว่าง
11:00-11:45	Pharmacokinetics of herbal extract: A case study of ECa 233 เภสัชกร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฐ เขมาวุฒม์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11:45-12:45	Lunch symposium Merck Technology Platforms for Pharmaceutical Science Studies and Quality Control คุณสวิชญา พรบุญสถิต
12:45-13:45	Molecular regulation of cancer stem cell in lung Cancer เภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ จันทร์วรโชติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 13:45-14:30 The acute ER stress mediates proteasome degradation of the membrane Hsp40 JB12, the component of RMA1 E3 ligase complex, in response to apoptosis
ดร.ภัทรารุช โสภา
สถาบันบัณฑิตศึกษาดูหาภรณ์ ราชวทยาาลัยดูหาภรณ์
- 14:30-14:45 รั้บประทานอาหารว่าง
- 14:45-15:15 Update on in vitro models in nanotechnology and drug development research
เภสัษกรหญิง ดร.ศศัษร เอื้อวรัยะวรัย
ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- 15:15-16.00 Nanoparticle based- drug delivery system for current targeted therapy
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 16:00-16:30 การมอบรางวัลเกียรติยศ ศาสตราจารย์ นพ.อวย เกตุสิงห์
ด้านผลงานวิจัยดีเด่นด้านเภสัชวิทยาประจำปี 2560
มอบรางวัลนำเสนอผลงานวิชาการโปสเตอร์และพีธีปิด
โดย นายกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

วันที่ 3: เสาร์ที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ.2560 (ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

- 9:00-16:00 Workshop :Zebrafish in Experimental Pharmacology
ดร.วิทยา พิมทอง
ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ปาฐกถาเกียรติยศ รองศาสตราจารย์ ดร. จีรวุฒิ สดาวงศ์วิวัฒน์

Redox Signaling: from Life to Death

Prof. Veerapol Kukongviriyapan, Ph.D.

*Department of Pharmacology,
Faculty of Medicine, Khon Kaen University*

Reactive oxygen species have important functions in living organisms from fertilization, growth, senescence till death. Oxidative stress, a condition implicits where pro-oxidants overwhelming antioxidants and resulting potential damage to biomolecules, has been reportedly implicated in various pathological conditions in most human diseases. Thus, common antioxidants have been used with an inflationary passion as panacea for various diseases. However, most clinical studies have been turned out to be disappointed. It has been recently realized that oxidants may target biomolecules in a specific manner by altering the oxidation-reduction (redox) potential with subsequent changes in their functions. The target proteins, mostly containing critical cysteinyl residues, function specifically in signal transduction pathways, thereby, linking redox shifts to phosphorylation /dephosphorylation signaling. It is, therefore, more detailed molecular understanding is needed to enable us to intervene redox breakdown into therapy. In some cancers, the cells have an increase in oxidants formation for stimulation of cell growth and development and that occurs simultaneously with an over-expression of Nrf2. Nrf2 is a cellular redox sensor, activated by oxidative stress and insulting xenobiotics and is regarded as a major antioxidant node regulating expression of cytoprotective, antioxidant and redox regulating genes. Nrf2 has been traditionally considered as a tumor suppressor. However, recent studies suggested that Nrf2 also has functions in protecting tumor and supporting aerobic glycolysis in maintenance of tumor growth. Inhibition of Nrf2 or some downstream effectors such as HO-1 and NQO1 has proved the concept that redox shift in cancer cells results in altering Nrf2 functions to be oncogenic and thus Nrf2 may be a potential therapeutic target in cancer treatment.

Acknowledgement: This work was supported by Thailand Research Fund, National Research Council of Thailand, Grant-in-aids from Khon Kaen University and Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

Keywords: Redox, Oxidative stress, Antioxidant, Nrf2

Quantitative Systems Pharmacology: New approaches to drug discovery and stratified medicine

Somponnat Sampattavanich, Ph.D.

*Siriraj Laboratory for Systems Pharmacology,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University*

Systems pharmacology has become a major focus at research institutes and big pharma around the world. From the identification of novel therapeutic targets to the discovery of biomarkers in pharmacogenomic studies, Systems Pharmacology can offer quantitative, fully mechanistic, and systematic solutions about drug actions at all scales. In addition to insights on the predicted target, we also learn about the polypharmacological effects on adjacent molecules within the same signaling network. Such integrated perspectives are necessary for the understanding of heterogeneous therapeutic response across patient subpopulation.

At the Siriraj laboratory for Systems Pharmacology, we focus on applying modern quantitative methodology to simplify sophisticated biological systems and to translate benchtop research into clinical practice at the bedside. These approaches help identify patterns from biomedical ‘big data’ that ultimately result in predictive models of drug response. In this talk, I will use examples from our three most recent projects. First, I will talk about our efforts to develop innovative platforms for high-throughput drug screening and its potential use in drug discovery. Second, I will share insights from our systems-based drug response profiling in cholangiocarcinoma. Finally, I will discuss our contributions towards precision oncology for Thai patients, to develop patient-derived avatar models as *ex vivo* models for personalized drug testing.

Keywords: Systems Biology, Heterogeneity, Single-cell analysis

Advancement of precision medicine in cancer

Asst. Prof. Suphat Subongkot, BCP, BCOP

*Clinical Pharmacy Division,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University*

Progresses in tumor genomics are leading to a new era in oncology where malignancies will be extensively characterized for mutations and molecular abnormalities, and treatment will be based primarily on the identified molecular findings rather than the type of cancer. This approach to treatment is recognized as precision medicine.

While pharmacogenetics principles have been used for many years in developing drugs as with the Thymidylate Synthase target for 5-fluorouracil, it has been most recently the true potential power of pharmacogenetics has come to fruition with imatinib in the treatment of chronic myelogenous leukemia. Recently more studies have examined specific patient responses to therapy and exploring the role of drug metabolizing polymorphisms. A classic example is that again of dihydro-pyrimidine dehydrogenase deficiency and the potential for severe toxicity related to 5-FU. More recently a polymorphism in UDP glucuronosyltransferase (UGT), which inactivates the active metabolite of irinotecan, causing some individuals increased toxicity. Of course long known polymorphisms in cytochrome P450 may cause increased or decreased response. For example, CYP2D6 polymorphisms result in poor metabolizers, normal metabolizers, extensive metabolizers, and ultraextensive metabolizers. Drugs metabolized through this enzyme include codeine and tamoxifen which are metabolized into active agents and thus poor metabolizers have decreased activity with these agents. On the other hand, certain 5-HT₃ antagonists like dolasetron, tropisetron and to a lesser extent ondansetron are inactivated through CYP2D6 and it appears that ultrametabolizers may have an increased risk of nausea and vomiting.

The development of pharmacogenetics and pharmacogenomics is truly in its infancy but will probably play a leading role in selecting drug therapy in the near future. With this, new study design as well as new ways of evaluating therapies may be required.

Systems biology approach to precision medicine

Trairak Pisitkun, M.D., Ph.D.

*Systems Biology Center, Research Affairs,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University*

The success of the “human genome project” has marked the beginning of the 21st century inter-disciplinary field of science called “Systems Biology”. It focuses on complex interactions within biological systems, using a more holistic perspective approach to biological and biomedical research. Systems biology is an integration of basic and clinical science standpoints, large-scale “omics” technologies, and high-level computational methods for data analysis and interpretation. In this lecture, we discuss the applications of several state-of-the-art methods in systems biology, including protein mass spectrometry, next-generation sequencing, and computational techniques, for developing the novel translational approach in medicine namely “precision medicine”.

Keywords: Systems Biology, Omics, Mass Spectrometry

Engineered synthetic antibody for cancer detection and treatment

Asst. Prof. Peti Thuwajit, M.D., Ph.D.

*Department of Immunology,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University*

Cancer is a disease with massive genetic alteration, so there should be expression of some antigens that can be used as specific marker for cancer cells. Recent antibody technology can be performed *in vitro* and used for detection or inactivation of the cancer progression or both. The antibodies can be applied in *ex vivo* and *in vivo* manners. Many kinds of antibody library such as F_{ab}, single chain variable fragments (ScFv), etc., have been developed and some were commercialized for screening of new specific antibody for clinical applications of cancer diagnosis and treatment. These antibodies can be also engineered and labelled with the signal for specific *in vivo* imaging detection of the cancer. On the other way, they can be used for carrying of the cytotoxic drug and kill cancer cells specifically. Antibodies themselves may have inhibitory effects when bind to antigen on cancer cells. The diagnosis and therapeutic properties of engineered antibodies can occur together that termed as “Theranostic”. The development of ScFv against protein periostin, a secretory protein that can activate cancer progression, and its function against cancer progression will be presented. Therefore, the promising of the antibody engineering technique for cancer detection can be applied and upgrade the early diagnosis and following up of the cancer, leading to the appropriate treatment to the patients.

Keywords: Antibody, Single chain variable fragment (ScFv), Cancer, Periostin

NK cell-based immunotherapy in viral infection and its clinical approach

Pattaravadee Srikoon, Ph.D.

*Division of Biopharmacy,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University*

Natural killer (NK) cells play crucial roles in the innate immune defensive system against tumor cells and viral infection. They are equipped with an array of activating and inhibitory receptors that stimulate or diminish NK cell activity, respectively. The regulation of NK function is well-regulate by enormous expression of NK receptors expressed on cell surface. Four NK subsets have been categorized based on the different expression levels of CD16 and CD56.

Our study shows NK cell repertoire which was attenuated in hepatitis C virus (HCV) infection. Cytotoxic and IFN- γ were reduced in naïve HCV patients, and then reversed after treatment with PEG-IFN- γ and ribavirin. Same as the study of HIV infection in NK cells, as a possible target of viral infection; we found the diminish of CD56^{dim}CD16⁻ NK cell subset. On the other hand, comparable functional activities between NK cells from cord blood mononuclear cells (CBMC) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by cytokine stimulation have been documented. Our study reveals that NK cells from CBMC and PBMC which have different immunophenotypic characteristics, could be stimulated to yield the comparable functional activities with the elevated CD56^{dim}CD16⁻ NK cell population in CBMC. Therefore, CD56^{dim}CD16⁻ NK cell population may be the promising cell for NK cell-based therapeutic strategies for the treatment of cancer and viral infection.

Diverse approaches encompass the development of large-scale NK cell-expansion protocols for adoptive transfer including the establishment of a microenvironment favorable to NK cell activity. More encouraging advances have been made with allogeneic NK cell therapy in clinical trials to overcome this limitation.

Keywords: Natural killer, HCV, HIV, cord blood

แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย

นายแพทย์สุเทพ วัชรปยานันท์

อธิบดีกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีประวัติศาสตร์มาอย่างยาวนาน มีทุนทางวัฒนธรรม (Cultural Capital) ที่สั่งสมมาอย่างต่อเนื่อง ทุนทางธรรมชาติ (Natural Capital) ที่มีความหลากหลายไม่แพ้ชาติใดในโลกทุนทั้งสองประการนี้ได้ก่อให้เกิด “สมุนไพร” ที่บรรพบุรุษของเราใช้ในการดูแลสุขภาพ การเสริมความงาม และนำมาเป็นอาหาร ที่สืบทอดกันมาจากรุ่นสู่รุ่น มีการพัฒนามาโดยลำดับตามวิทยาการและเทคโนโลยีในแต่ละสมัย

รัฐบาล ซึ่งนำโดยพลเอกประยุทธ์ จันทร์โอชา นายกรัฐมนตรี ได้เล็งเห็นศักยภาพของสมุนไพรไทยจึงมีข้อสั่งการเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2558 “ให้กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องพัฒนาพืชสมุนไพรไทยให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อให้เกิดที่ยอมรับและสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสมุนไพรไทย” กระทรวงสาธารณสุขจึงได้มอบหมายให้กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกเป็นแกนกลางในการประสานกระทรวงที่เกี่ยวข้องอีก 8 กระทรวง รวมถึงองค์กรเอกชนร่วมกันจัดทำแผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560 – 2564 และคณะรัฐมนตรีได้ให้ความเห็นชอบ เมื่อวันที่ 4 ตุลาคม 2559 โดยกำหนดจุดยืนของประเทศไทยให้เป็นประเทศผู้นำการส่งออกวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยของภูมิภาคอาเซียนภายในปี 2564

แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560 – 2564 ประกอบด้วย 4 ยุทธศาสตร์ คือ

ยุทธศาสตร์ที่ 1 ส่งเสริมผลิตผลของสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพตามความต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ มีเป้าประสงค์เพื่อส่งเสริมการปลูก การแปรรูปสมุนไพรที่มีมาตรฐาน ปริมาณวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพ มีความเพียงพอใกล้เคียงต่อความต้องการใช้ของผู้ประกอบการ อุตสาหกรรม การพัฒนาสายพันธุ์ การจัดทำมาตรฐานพืชสมุนไพร และการอนุรักษ์สมุนไพรไทยให้คงไว้ใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน

ยุทธศาสตร์ที่ 2 พัฒนาอุตสาหกรรมและการตลาดสมุนไพรให้มีคุณภาพระดับสากล มีเป้าประสงค์เพื่อ พัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีศักยภาพในการแข่งขันทางการตลาดทั้งในและต่างประเทศ โดยใช้งานวิจัยและนวัตกรรมเป็นฐานในการพัฒนา

ยุทธศาสตร์ที่ 3 ส่งเสริมการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคและการสร้างเสริมสุขภาพ มีเป้าประสงค์เพื่อ เพิ่มการใช้สมุนไพรในระบบสุขภาพ ในการรักษาโรคและเสริมสร้างสุขภาพ และ

เสริมสร้างพื้นฐานการพัฒนาการแพทย์แผนไทยและสมุนไพรไทยให้เป็นส่วนหนึ่งของระบบสุขภาพของประเทศในระยะยาว

ยุทธศาสตร์ที่ 4สร้างความเข้มแข็งของการบริหารและนโยบายภาครัฐเพื่อการขับเคลื่อนสมุนไพรไทยอย่างยั่งยืน มีเป้าประสงค์เพื่อให้ประเทศไทยมีกลไกในการพัฒนาสมุนไพรที่มีศักยภาพเพื่อสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศ

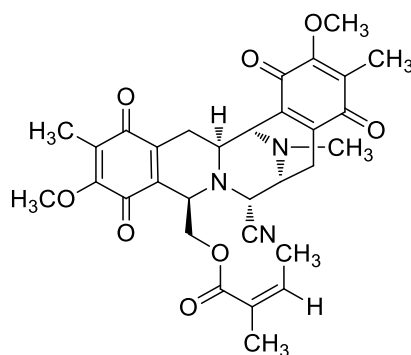
แผนแม่บทฉบับนี้ จะทำให้ประเทศไทยเกิดการพัฒนาสมุนไพรอย่างจริงจัง และต่อเนื่อง โดยอาศัยความร่วมมือทั้งจากภาครัฐและเอกชนตลอดห่วงโซ่คุณค่า (Value Chain) ตามแนวทางประชารัฐ สอดคล้อง Thailand 4.0 ที่จะขับเคลื่อนประเทศให้ก้าวข้ามกับดักรายได้ปานกลาง เป็นประเทศที่มีรายได้สูง ผ่านเครื่องยนต์ 3 ตัวคือ Inclusive Growth Engine, Productive Growth Engine และ Green Growth Engine เราจะพัฒนา“สมุนไพรไทย” เพื่อสร้างความมั่นคงทางสุขภาพและความยั่งยืนของเศรษฐกิจไทย

Renieramycin Alkaloids from the Thai Blue Sponge, *Xestospongia* sp. as New Anticancer Agents

Khanit Suwanborirux, Ph.D.

*Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University*

Renieramycin alkaloids are bistetrahydroisoquinoline marine natural products mainly isolated from marine sponges of some particular genera. Renieramycin M was isolated as a major component in a large quantity from the blue sponge *xestospongia* sp., collected around Sichang island of Thailand. Renieramycins possessed highly potent cytotoxicity with IC₅₀ values in nM levels toward a wide range of human cancer cell lines such as breast, colon, lung, pancreatic, and prostate cells. Our continuing effort has been aimed to establish the medicinal chemistry of the marine-derived renieramycins for further development as new anticancer agents. Using renieramycin M as a starting parent compound, we were able to semi-synthesize several renieramycin analogues, with an eye to improve cytotoxicity profiles. In this presentation, the structure-cytotoxicity relationships, potency profiles and mechanistic studies of their cytotoxicity will be discussed.



Renieramycin M

Keywords: Renieramycin Alkaloids, Bistetrahydroisoquinoline, Marine Natural Products, Anticancer Agents, *Xestospongia* sp. Sponge

Pharmacokinetics of Herbal Extracts: A Case Study of ECa233

Asst. Prof. Phisit Khemawoot1, Ph.D.

*Department of Pharmacology and Physiology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University*

Traditional medicine serves as an alternative choice of disease prevention as well as therapy for people in developing countries. Recent advancements in pharmacognosy research have led to elucidation of several active ingredients and chemical structures from various herbal extracts of traditional medicine. However, most herbal studies discontinue their research at the stage of drug development due to several reasons. Among them, pharmacokinetic studies needed for an appropriate dosing interval is the most problematic one, and it is the bottle neck for the development of bioactive extract from plants for human use.

C. asiatica is selected as a candidate for our collaborative programs of drug discovery and development from natural resources. The plant is well documented for treatment of wound healing, improvement of cognitive functions, and other therapeutic records since ancient time. Recently, a group of scientists from Chulalongkorn University has successfully developed a standardized extract of *C. asiatica* (ECa233) that consistently contains triterpenoid glycosides more than 80%, and the major constituents are madecassoside and asiaticoside at the ratio of $1.5 \pm 0.5: 1$. This standardized extract, ECa233, exerts several excellent efficacies in line with its traditional uses. However, information on pharmacokinetic data of ECa233 and its active ingredients are scarce. Though some pharmacokinetic information of the two major constituents per se do exist but information on their oral bioavailability, tissue distribution and thorough metabolic pathway are not yet explored. We therefore, aim to conduct comparative pharmacokinetic studies of ECa233 in relation to asiaticoside and madecassoside per se. Surprisingly, asiaticoside and madecassoside contained in ECa233 demonstrated longer half-life than their separately given pure compounds. Data from these studies are essential information to define a proper dosing regimen in human subjects to achieve maximal efficacy and minimal toxicity of ECa 233 in the future.

Keywords: *Centella asiatica*, ECa233, madecassoside, asiaticoside, pharmacokinetics

Molecular Regulation of Cancer Stem cell in Lung Cancer

Assoc. Prof. Pithi Chanvorachote, Ph.D.

*Department of Pharmacology and Physiology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University*

As a hallmark of cancer aggressiveness and subsequent metastasis, the certain subpopulation of cancer cells exhibiting phenotypes of stem cells, so called cancer stem cells (CSC), is among the most famous target study in cancer research nowadays. Therefore, identification of the potential factors facilitating transformation of the normal cancer cell to CSC and its regulatory mechanisms will provide new insight in cancer cell biology, which can be utilized for the development of new therapeutic strategies against aggressive cancer. Our works have focused on the regulatory roles and mechanisms of substances including nitric oxide (NO), iron and zinc ion on cancer stem cell (CSC) properties in human lung cancer cells. We found that NO as well as iron exposure could enhance CSC signals, markers, and behaviors in the lung cancer cells, while treatment of the lung cancer cell with zinc exhibited the opposite effect. Taken together, we provided important insights regarding roles and mechanisms of endogenous and exogenous substances in regulating cancer stemness. Even though clinical and in vivo data are of necessity, this knowledge based on cellular and molecular investigations offered a potential opportunity to develop a new strategy in treating lung cancer by targeting CSC potentiating factors and signals. Also, the impact of cancer microenvironment-derived mediators and exogenous compounds on cancer cell behaviors might draw an interest toward investigation those reactive species as a possible target in supporting lung cancer treatments or use with caution in high cancer-risk population.

The ER membrane-located RMA1 E3 ligase complex is involved in ERQC autophagy and priming stressed cells to apoptosis

Pattarawut Sopha^{1,2}, Scott A. Houck², Hong Yu Ren², and Douglas M. Cyr²

¹ *Laboratory of Cellular Stress Responses, Program of Applied Biological Sciences, Chulabhorn Graduate Institute, Bangkok, Thailand*

² *Department of Cell Biology and Physiology, School of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA*

Protein homeostasis at the Endoplasmic Reticulum (ER) is required fidelity of protein quality control (PQC) to minimize proteotoxicity from flux of protein synthesis and secretion. Once disturbed, the ER protein homeostasis can be recovered by attenuation of protein translation into ER, transcriptional activation of ER chaperones and folding factors, and degradation of stress-affected misfolded proteins from the ER by cytosolic proteasome through the so-called ER-associated degradation (ERAD) pathway. The RMA1 E3 ligase complex has been identified as an ERAD component that targets misfolded membrane proteins for degradation. The complex is included single-pass transmembrane E3 ligase RMA1, ERAD adaptor Derlin-1, cytosolic Hsc70, and newly-identified transmembrane Hsp40 DNAJB12 (JB12). In this presentation, data will be presented to demonstrate the roles of the RMA1 complex in the triage decision for a recently-discovered misfolded membrane protein, gonadotrophin-releasing hormone receptor (GnRHR-E90K), that is ERAD resistant but degraded by novel ERQC autophagy. In addition, the RMA1 complex was explored during the ER stress situation that selectively mediated proteasome degradation of JB12. Regulation of ER stress-activated JB12 degradation appeared to involve in priming cells for apoptosis upon acute and severe ER stress situation. Hence, these investigations exhibit the roles of ER membrane-anchored chaperones and folding factors in controlling protein homeostasis and intracellular signaling in response to proteotoxic stress.

Keywords: Protein homeostasis, ER Stress, ER-associated degradation, Hsp40/J-protein, Protein quality control, autophagy

Update on In vitro Models in Nanotechnology and Drug Development Research

Sasitorn Aueviriyavit, Ph.D.

*INano Safety and Risk Assessment Laboratory,
National Nanotechnology Center,
National Science and Technology Development Agency*

Advances in nanotechnology are providing to medicine a new paradigm in valuable areas especially drug delivery system, diagnosis and treatment. To minimize the failure rates in mandatory phase of clinical trials, preclinical research needs the experimental animal models to predict efficacy, pharmacokinetic and safety profiles of lead compounds. However, animal models are very costly, labor intensive, time-consuming, species-different and questionable ethically. Regarding to the ethical issues, European Directive (2010/63/EU) has announced the protection of animals used for scientific purposes by following 3Rs principle: reduction, refinement, replacement. In addition, EU Cosmetic Products Regulation (EC) prohibits the testing of finished cosmetic products and cosmetic ingredients on animals (testing ban) and prohibits the marketing in the European Community, of finished cosmetic products and ingredients included in cosmetic products that were tested on animals (marketing ban). For these reasons, there has been increasing interest in development of *in vitro* models as alternatives.

In this presentation, the update on *in vitro* models used in nanotechnology and drug development research will be reviewed and discussed. Mimicking the microenvironment in the human tissues leads to more physiological and predictive *in vitro* models, which may help to reduce animal experimental. Among developed *in vitro* models, the immortalized cells established from cancerous cells have been widely used because of easiness in cell culture and high reproducibility. However, reliability of the results derived from immortalized cells has been unclear because of their different characteristics from normal cells. To overcome the limitation of immortalized cells and 2D culture, other have attempted to recreate the normal three-dimensional (3D) architecture of the tissues lining *in vitro* to recapitulate the mechanically active microenvironment of human tissues. Finally, the most difficulty of developing *in vitro* models are the predictive alternatives for assessment of systemic exposure. To overcome this challenge, “human-on-a-chip” concepts are in updated trend to replace the respective animals and humans in substance evaluation with functional human organisms.

Keywords: Alternative Models, In Vitro Models, Nanotechnology, Drug Development Research

Nanoparticle based- drug delivery system for current targeted therapy

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Proceedings & Abstracts

B02

Urinary Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-6 in Lupus Nephritis Responders: A Preliminary Study

Chutipha Phromjeen¹, Pajaree Chariyavilaskul^{2,4}, Yingyos Avihingsanon^{2,3,4}

¹ *Inter-department of pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

² *Clinical Pharmacokinetic Research Unit in Renal and Cardiovascular diseases, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

³ *Lupus Research Unit, Division of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand*

⁴ *Center of Excellent Immunology and Immune-mediated Diseases, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Abstract

Lupus nephritis (LN) is one of the most serious manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE). Despite the improvement in the field, up to one-third of LN patients still do not respond to initial immunosuppressive treatment. Many inflammatory cytokines/chemokines have been shown as LN biomarkers. In this study, we assessed the levels of urinary vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-6 (IL-6) during an induction phase (baseline, 1- and 3-month of the treatment) in 17 LN patients responding to various immunosuppressants such as intravenous cyclophosphamide (IVCY), mycophenolate mofetil (MMF) and tacrolimus. No statistically significant changes were seen in all urinary biomarkers (VEGF: baseline 2.37 (1.02-3.17) pg/mg creatinine, 1-month 2.31 (1.57-3.04) pg/mg creatinine, 3-month 1.76 (1.42-3.15) pg/mg creatinine and IL-6: baseline 0.031 (0.018-0.153) pg/mg creatinine, 1-month 0.032 (0.004-0.081) pg/mg creatinine, 3-month 0.013 (0.004-0.04) pg/mg creatinine, all $p > 0.05$). However, we found a correlation between IL-6 and urinary protein/creatinine ratio (UPCR) ($p < 0.05$). Profiles of urinary biomarkers in Thai LN patients responding to an induction treatment were shown in this study. Further studies in larger group of patients compared to those who do not respond to the treatment and/or healthy controls are needed in order to prove if the biomarkers are useful as predictors for treatment outcomes.

Keywords: Lupus nephritis, intravenous cyclophosphamide, mycophenolate mofetil, tacrolimus

Vascular endothelial growth factor และ Interleukin-6 ในปัสสาวะของ ผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังที่ตอบสนองต่อยาควบคุมภูมิคุ้มกัน: การศึกษาเบื้องต้น

ชุตติภา พรหมจีน¹, ปาจริย์ จรรย์วิลาศกุล^{2,4}, ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์^{2,3,4}

¹ สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

² หน่วยวิจัยเภสัชจลนศาสตร์คลินิกโรคไต หัวใจและหลอดเลือด ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

³ สาขาวิชาโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

⁴ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

บทคัดย่อ

ภาวะไตอักเสบเรื้อรังเป็นภาวะที่มีความรุนแรงมากในผู้ป่วยที่เป็นโรคไตหรือโรคเอสแอลอี ซึ่งอาจนำไปสู่การเสียชีวิตหรือพัฒนาไปสู่ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการศึกษาพัฒนาทั้งด้านการวินิจฉัยและการรักษาอย่างแพร่หลาย แต่ก็ยังพบว่าผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังบางส่วนไม่ตอบสนองต่อการรักษา การพัฒนาเครื่องมือในการติดตามและทำนายผลการรักษาจึงเป็นทางเลือกที่เป็นประโยชน์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในปัสสาวะ ได้แก่ vascular endothelial growth factor (VEGF) และ interleukin-6 (IL-6) ในระยะชักนำให้โรคสงบ (ก่อนได้รับการรักษา และหลังได้รับการรักษาแล้วเป็นเวลา 1 เดือนและ 3 เดือน) โดยศึกษาในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังชาวไทยจำนวน 17 คน ที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากดภูมิชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไฮโดรคลอโรสฟาไมด์ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือดดำ มัยโคฟีโนเลทโมฟิซิล และทาโครลิมุส ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในปัสสาวะของผู้ป่วย (VEGF: ก่อนได้รับการรักษา 2.37 (1.02-3.17) พิโกกรัม/มิลลิกรัมครีเอตินิน, 1 เดือน 2.31 (1.57-3.04) พิโกกรัม/มิลลิกรัมครีเอตินิน, 3 เดือน 1.76 (1.42-3.15) พิโกกรัม/มิลลิกรัมครีเอตินินและ IL-6 baseline 0.031 (0.018-0.153) พิโกกรัม/มิลลิกรัมครีเอตินิน, 1 เดือน 0.032 (0.004-0.081) พิโกกรัม/มิลลิกรัมครีเอตินิน, 3 เดือน 0.013 (0.004-0.04) พิโกกรัม/มิลลิกรัมครีเอตินิน, $p > 0.05$) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า ระดับของ IL-6 มีความสัมพันธ์กับระดับของสัดส่วนโปรตีนกับครีเอตินินในปัสสาวะ ($p < 0.05$) ค่าตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังชาวไทยที่ตอบสนองต่อการรักษาในระยะชักนำให้โรคสงบได้แสดงไว้ในการศึกษาครั้งนี้ ในอนาคตควรมีการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นรวมทั้งเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาหรืออาสาสมัครสุขภาพดี เพื่อพิสูจน์ว่าตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในปัสสาวะดังกล่าวสามารถใช้ทำนายการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังหรือไม่

คำสำคัญ: ไตอักเสบเรื้อรัง, ไฮโดรคลอโรสฟาไมด์, มัยโคฟีโนเลทโมฟิซิล, ทาโครลิมุส

Introduction

Refractory lupus nephritis (LN) occurs in a substantial proportion of LN patients and the treatments of this group of patients remains challenging.¹ LN patients are heterogeneous in terms of clinical presentations, including the rate of deterioration of glomerular filtration rate, various degrees of persistent proteinuria, active urinary sediments, and the ongoing kidney inflammation leading to irreversible damage caused by scarring and fibrosis. Therefore, specific monitoring is very essential to improve prediction of treatment results. Although renal biopsy is a standard effective procedure for follow-up, it is an invasive technique accounted for complications such as the presence of blood in urine and pain at the biopsy area. Moreover, post-biopsy infection may lead to morbidity and mortality.² A non-invasive tool, especially urinary biomarkers, used to monitor relapse, guide treatment decision or predict the treatment outcomes is extremely necessary in LN. To date, several urinary biomarkers are identified but none of these biomarkers is well studied particularly in Thai patients.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a family of multipotent cytokines. In the kidneys, VEGF is most expressed in glomerular podocytes and in tubular epithelial cells. The roles of VEGF in kidney are still unclear but many evidences indicate the importance of VEGF in development of the glomerular filtration barrier and control of vascular permeability.^{3,4} VEGF is an interesting molecule in renal diseases. Studies showed correlations of VEGF expression and disease progression. Intra-renal expression of VEGF and its receptors were up-regulated in experimental animal models and patients with type-1 and type-2 diabetes. In these models, inhibition of VEGF was associated with the diabetes-associated renal changes, showing the role of VEGF in pathophysiology of diabetes nephropathy.⁵ Moreover, urinary VEGF levels and intra-renal VEGF protein expressions were higher in class IV LN patients than in healthy control.^{6,7} Importantly, urinary VEGF mRNA levels was shown to predict clinical therapeutic response of class IV LN.⁸ Interleukin-6 (IL-6) is a cytokine that induces T lymphocytes differentiation, B lymphocytes development, and production of acute phase proteins. IL-6 also drives production of IL-17-producing T cells. Increased urinary IL-6 levels were shown in LN patients compared to lupus patients without renal involvement.⁹

The objective of this study was to assess the changes if the levels of urinary VEGF and IL-6 protein in responsive LN patients during an induction phase of the treatment.

Materials and Methods

Patients

Seventeen patients were studied. All of them were diagnosed with SLE according to the American College of Rheumatology diagnostic criteria for SLE¹⁰ and had LN documented by having one of the following criteria: 1) a total urinary

protein level of more than 0.5 g/day, 2) an increment of serum creatinine levels of more than 0.5 mg/dl during 1 month period, or 3) the presence of pyuria, hematuria, or urinary cast by microscopic examination. All patients' biopsy specimens were identified as class III/IV LN by the classification of the histologic types of LN according to the World Health Organization criteria.¹¹ All patients received oral prednisolone at the dose of 0.5 mg/kg/day plus a 6-month regimen of one of these immunosuppressants: intravenous pulse cyclophosphamide (IVCY; 500 mg/m² every 2 weeks), oral mycophenolate mofetil (MMF; 2,000 mg/day) or oral tacrolimus (0.1 mg/kg/day). All patients were responders at 6 months after treatment as defined by the following clinical criteria, including (1) a stabilization and/or an improvement in renal function as documented by serum creatinine or (2) $\geq 50\%$ decreased in hematuria to less than 10 red blood cell per high-power field or (3) a significant reduction in proteinuria ($\geq 50\%$ reduction to less than 3 g/day if baseline proteinuria was in nephrotic range, ≤ 1 g/day if baseline proteinuria was in non-nephrotic range) for at least 3 months.¹² Urine samples were collected at pretreatment including the first and third month of the treatment. This study was approved by the Ethics Committee for Human Research, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Written informed consents were obtained from all subjects.

Urine samples collection

Fifty milliliters of mid-stream spot urine samples were collected and were immediately centrifuged at $1000 \times g$ for 30 min at 4°C. Supernatant of the samples was kept at -80°C until analysis.⁸

VEGF and IL-6 measurements

Urinary VEGF and urinary IL-6 levels were quantified using a Human Cytokine Panel Luminex Performance Assay (R&D Systems). Values were normalized to urinary creatinine concentrations measured in the same spot urine, and were expressed as pg/mg Creatinine.

Data analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software (version 20). The continuous data are expressed as median (interquartile range; IQR). Differences between groups were assessed using an unpaired-Student's *t* test and one-way analysis of variance (ANOVA). Correlations were assessed using the Spearman method. The threshold of significance was $p < 0.05$.

Results

Patient characteristics

Demographic data of the studied patients are summarized in Table 1. There were four patients received IVCY, nine patients with MMF and four patients with tacrolimus.

Serial monitoring of urinary cytokines levels

There were no statistically significant changes observed for all urinary biomarkers measured from baseline to three months during an induction phase of the treatment (Table 2).

Correlations of urinary VEGF and IL-6 levels with conventional biomarkers

Urinary IL-6 levels were significantly correlated with urinary protein/creatinine ratio UPCR ($r = 0.53$; $p < 0.05$) (Table 3 and Figure 1).

Table 1. Patients' characteristics.^a

Demographic	All	IVCY	MMF	Tacrolimus	<i>p</i> -value
Number (n)	17	4	9	4	na
Sex (F/M)	15/2	4/0	8/1	3/1	
Age (years)	32(28-43)	34(26.8-47.3)	37(27-45.5)	32(27.9-36)	0.59
Race (%)					
Thai (%)	100	100	100	100	na
Other (%)	0	0	0	0	na
Baseline laboratory parameters					
Serum creatinine (mg/dL)	0.83(0.68-1.18)	1.04(0.79-1.23)	0.80(0.53-1.07)	0.8(0.6-1.12)	0.54
Urinary protein/creatinine ratio	1.8(1.12-3.81)	1.75(0.98-3.71)	1.60(0.96-5.03)	2.99(1.85-4)	0.84
Glomerular filtration rate (mL/min/1.73m²)	77.34 (58.39-101.76)	64.82 (52.96-90.67)	85.74 (65.17-155.06)	86.49 (62.10-127.17)	0.62
Urinary erythrocyte count (per high power field)	3(1-5)	3(1-16.25)	3(1.50-5)	2(1.25-4.25)	0.62
6th month laboratory parameters					
Serum creatinine (mg/dl)	0.89(0.79-1.23)	1.1(0.84-1.72)	0.86(0.67-0.91)	1.01(0.8-1.42)	0.19
Urinary protein/creatinine ratio	0.43(0.28-0.9)	0.64(0.2-0.92)	0.4(0.28-0.55)	0.69(0.3-2.47)	0.42
Glomerular filtration rate (mL/min/1.73m²)	75.17 (51.89-87.53)	57.67 (38.89-85.03)	75.19 (73.12-121.87)	65.58 (46.46-88.52)	0.78
Urinary erythrocyte count (per high power field)	1(1-3)	2(1.25-4.25)	1(0-4)	1.5(1-2.75)	0.78

^a Values are median (IQR).

IVCY; intravenous cyclophosphamide, MMF; mycophenolate mofetil, na; not applicable.

Table 2. Levels of urinary VEGF and IL-6.^a

	Baseline	1 st month	3 rd month	<i>p</i> value
All (n=17)				
VEGF	2.37 (1.02-3.17)	2.31 (1.57-3.04)	1.76 (1.42-3.15)	0.82
IL-6	0.031 (0.018-0.153)	0.032 (0.004-0.081)	0.013 (0.004-0.040)	0.14
IVCY (n=4)				
VEGF	1.2 (0.41-2.95)	2.39(1.36-2.88)	1.72 (1.26-2.5)	0.67
IL-6	0.060 (0.020-0.220)	0.070 (0.030-0.120)	0.070 (0.010-0.280)	0.99
MMF (n=9)				
VEGF	2.6 (1.49-4.66)	2.31(1.83-3.73)	2.29 (1.67-3.53)	0.90
IL-6	0.030(0.020-3.670)	0.004 (0.001-0.04)	0.010 (0.002-0.030)	0.09
Tacrolimus (n=4)				
VEGF	2.15 (1.33-4.8)	2.04(1.36-2.98)	1.63 (1.14-3.21)	0.94
IL-6	0.050 (0.020-0.110)	0.050 (0.010-0.140)	0.020 (0.005-0.070)	0.75

^a Values are median (IQR) in pg/mg Creatinine.

IVCY; intravenous cyclophosphamide, MMF; mycophenolate mofetil.

Table 3. Correlation between urinary VEGF and IL-6 protein levels and conventional biomarkers.

	VEGF		IL-6	
	Correlation Coefficient	<i>p</i> -value	Correlation Coefficient	<i>p</i> -value
<i>Conventional biomarkers</i>				
Serum Creatinine (mg/dL)	0.13	0.38	0.16	0.26
Urine per creatinine ratio	0.28	0.05	0.53	0.01
Glomerular Filtration Rate (mL/min/1.73m ²)	-0.15	0.31	-0.19	0.17
Urinary erythrocyte count (per high power)	0.03	0.84	-0.1	0.49

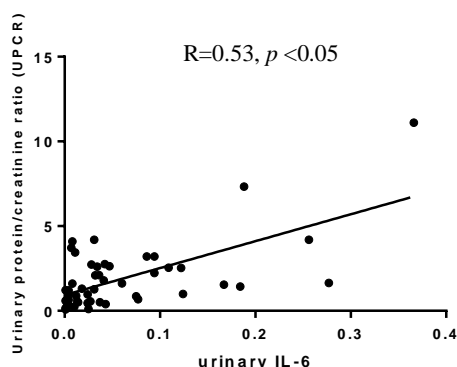


Figure 1. The correlation between urinary IL-6 protein levels and UPCR.

Discussion

In this study, we have shown profiles of urinary biomarkers from baseline to three months in Thai LN patients who responded to induction treatment by various immunosuppressants.

Avihingsanon *et al.* reported that the measurement of urinary mRNA VEGF was practical and should be applied in the diagnosis and the prediction of clinical response in class IV LN.⁸ In terms of IL-6, Linker-Israeli *et al.* found that endogenous IL-6 levels increased in lupus patients compared to controls.¹³ Brugos *et al.* also reported that urinary IL-6 levels increased in LN patients.¹⁴ Unfortunately, our data did not support these findings.

Although urinary VEGF and urinary IL-6 levels did not significantly reduce, this study found a significant association between urinary IL-6 levels and UPCR ($p < 0.05$). Since increased UPCR is a parameter reflecting disease activity in patients with glomerular and/or tubular damage, and is widely used as one of the response criteria in LN¹⁵, the association between urinary IL-6 and UPCR observed in this study suggests that this biomarker might be able to be used as a marker of disease activity and response to treatment in LN patients.

The reductions of urinary VEGF and urinary IL-6 levels in LN patients may be linked to the mechanism of action of immunosuppressive drugs received, especially, MMF and tacrolimus. MMF is a prodrug of mycophenolic acid (MPA) that inhibits inosine-5'-monophosphate dehydrogenase enzyme resulting in a depletion of guanosine nucleotides in T and B lymphocytes. The action of MPA lead to an inhibition of T and B cell proliferation, thereby suppressing cell-mediated immune responses and antibody formation.¹⁶ Tacrolimus, on the other hand, inhibits calcineurin in T lymphocytes, preventing its ability to dephosphorylate and activate nuclear factor of activated T (NFAT) cells. Tacrolimus affects the transcription of many cytokines that are crucial in the immune response process.¹⁷ In brief, urinary VEGF and urinary IL-6 levels are reduced as MMF and tacrolimus affect T lymphocyte, an inflammatory cell that produces these cytokines. In addition, tacrolimus was shown to suppress the function of activated macrophages and

promotes their apoptosis via mechanisms involve nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells and mitogen-activated protein kinase.¹⁸

This study was conducted in a very small group of patients. However, our data shows potential benefit as these are fundamental knowledge regarding urinary biomarkers in Thai LN patients. Studies in larger number of patients, comparing the data with non-responders and/or controls are required to elucidate the findings and to prove if these biomarkers are useful as predictors for treatment outcomes.

Conclusion

In Thai LN patients who are responded to an induction treatment at 6 months, reductions of urinary VEGF and urinary IL-6 were observed by 3-month post treatment. These data suggest the role of urinary biomarkers as a marker for disease activity and predictors of treatment outcomes.

Acknowledgements

This study was funded by National Science and Technology Development Agency (NSTDA: p-13-00505). The authors would like to thank Ms. Thitima Benjachat Sutthichet, PhD. for her invaluable technical supports.

References

1. Pons-Estel GJ, Serrano R, Plasin MA, Espinosa G, Cervera R. Epidemiology and management of refractory lupus nephritis. *Autoimmunity reviews*. 2011 Sep;10(11):655-63.
2. Avihingsanon Y, Hirankarn N. Major lupus organ involvement: severe lupus nephritis. *Lupus*. 2010 Oct;19(12):1391-8.
3. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw D, Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney international*. 2004 Jun;65(6):2003-17.
4. Eremina V, Quaggin SE. The role of VEGF-A in glomerular development and function. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004 Jan;13(1):9-15.
5. Bailey E, Bottomley MJ, Westwell S, Pringle JH, Furness PN, Feehally J, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA expression in minimal change, membranous, and diabetic nephropathy demonstrated by non-isotopic in situ hybridisation. *Journal of clinical pathology*. 1999 Oct;52(10):735-8.
6. Navarro C, Candia-Zuniga L, Silveira LH, Ruiz V, Gaxiola M, Avila MC, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2002;11(1):21-4.

7. Robak E, Sysa-Jedrzejewska A, Robak T. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Mediators of inflammation*. 2003 Oct;12(5):293-8.
8. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney international*. 2006 Feb;69(4):747-53.
9. Clark DN, Markham JL, Sloan CS, Poole BD. Cytokine inhibition as a strategy for treating systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology*. 2013 Sep; 148(3):335-43.
10. Markowitz GS, D'Agati VD. The ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis: an assessment at 3 years. *Kidney international*. 2007 Mar;71(6):491-5.
11. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney international*. 2004 Feb;65(2):521-30.
12. Boumpas DT, Balow JE. Outcome criteria for lupus nephritis trials: a critical overview. *Lupus*. 1998;7(9):622-9.
13. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *Journal of immunology*. 1991 Jul 01;147(1):117-23.
14. Brugos B, Vincze Z, Sipka S, Szegedi G, Zehner M. Serum and urinary cytokine levels of SLE patients. *Die Pharmazie*. 2012 May;67(5):411-3.
15. Renal Disease Subcommittee of the American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Response C. The American College of Rheumatology response criteria for proliferative and membranous renal disease in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Arthritis and rheumatism*. 2006 Feb;54(2):421-32.
16. Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2005;14 Suppl 1:s2-8.
17. Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013 Oct;23(10):563-85.
18. Yoshino T, Nakase H, Honzawa Y, Matsumura K, Yamamoto S, Takeda Y, et al. Immunosuppressive effects of tacrolimus on macrophages ameliorate experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Dec;16(12):2022-33.

B04

Combination Effect of Cepharanthine and 5-Fluorouracil on Human Colon Cancer in a Mouse Xenograft Model

Chanaporn kongsaden¹, Chandhanee Itthipanichpong², Piyanuch Wonganan²

¹*Medical Sciences Program in Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

²*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Abstract

Cepharanthine (CEP), a biscochlorine alkaloid extracted from *Stephania cepharantha* Hayata, has shown antitumor effects against several types of cancer such as leukemia, cholangiocarcinoma, hepatocarcinoma and non-small-cell lung cancer. We have previously found that CEP was able to enhance anti-cancer activity of 5-fluorouracil (5-FU) against human colon cancer *in vitro*. In the present study, we therefore evaluated the effect of CEP alone and CEP in combination with 5-FU in a colon cancer xenograft model. **Materials and Methods:** HT-29 tumors were established in the right flank of nude mice. Then, HT-29 tumor bearing mice were treated with either 5-FU or CEP alone or 5-FU combined with CEP by intraperitoneal injection every other day for three weeks. The mRNA levels of apoptosis regulators including Bak, Bax, Bcl-2 and Bcl-xl were determined by quantitative real-time RT-PCR. **Results:** Treatment with either CEP alone or CEP in combination with 5-FU significantly delayed tumor growth when compared with the control and 5-FU alone groups. Real-time RT-PCR analysis revealed that the combination treatment significantly up-regulated the levels of both pro-apoptotic regulators, Bak and Bax. **Conclusion:** CEP could enhance anticancer effect of 5-FU in a mouse xenograft model which may be associated with the up-regulation of Bak and Bax and CEP may potentially be used as a single agent or in combination with 5-FU for colon cancer treatment.

Keywords: 5-fluorouracil, cepharanthine, colon cancer, apoptosis

ผลของเซฟฟราแรนทีนเมื่อให้ร่วมกับ 5-ฟลูออโรยูราซิล ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ปลูกถ่ายในหนูเมาส์

ชนาภรณ์ กงสะเต็น¹, จันทนี อธิพานิชพงศ์², ปิยนุช วงศ์อนันต์²

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

บทคัดย่อ

Cepharanthine (CEP) เป็น biscochlorine alkaloid ที่สกัดได้จาก *Stephania cepharantha* Hayata ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งท่อน้ำดี, มะเร็งตับ และมะเร็งปอด เป็นต้น จากการศึกษาเบื้องต้นพบ CEP สามารถเสริมฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ของ 5-fluorouracil (5-FU) ในระดับหลอดทดลอง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของ CEP เมื่อให้ร่วมกับ 5-FU ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในระดับสัตว์ทดลอง โดยปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 เข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนังทางด้านขวาของสัตว์ทดลอง สัตว์ทดลองจะได้รับ 5-FU หรือ CEP เพียงอย่างเดียว หรือ ได้รับ 5-FU ร่วมกับ CEP โดยการฉีดเข้าช่องท้อง ทุก 2 วันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และศึกษาปริมาณ mRNA ของ Bak, Bax, Bcl-2 และ Bcl-x1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิสโดยใช้เทคนิค quantitative real-time RT-PCR จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การให้ CEP เพียงอย่างเดียว หรือให้ร่วมกับ 5-FU สามารถชะลอการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ 5-FU เพียงอย่างเดียว และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR พบว่าเมื่อให้ CEP ร่วมกับ 5-FU สามารถเพิ่มการแสดงออกของ Bak และ Bax ที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า CEP สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายมะเร็งของ 5-FU ในสัตว์ทดลองซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ CEP สามารถเพิ่มการแสดงออกของ Bak และ Bax ดังนั้นการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการนำ CEP มาใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่โดยอาจจะใช้เป็นยาเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับ 5-FU

คำสำคัญ: 5-ฟลูออโรยูราซิล, เซฟฟราแรนทีน, มะเร็งลำไส้, อะพอพโทซิส

Introduction

Colon cancer is one most common cancer which is leading cause of cancer death in both men and women worldwide [1]. The treatment options for colon cancer are surgery, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapy. Chemotherapeutic agents are commonly used to treat colon cancer include 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan. 5-Fluorouracil (5-FU), an antimetabolite drug, exerts its anticancer effects through inhibition of thymidylate synthase (TS) and incorporation of its metabolites into RNA or DNA [2]. Although 5-FU is widely used, its application in clinic is still limited due to drug resistance and serious side effects. Therefore, novel compounds that can potentiate anticancer effects of 5-FU are urgently needed.

Cepharanthine (CEP) is one of the biscochlorine alkaloids extracted from *Stephania cepharantha* Hayata, which has been widely used in Japan for treatment of many acute and chronic diseases. The pharmacological activities of CEP include anti-allergic, anti-oxidant, anti-malaria, immunomodulatory, multidrug resistance reversal and anticancer [3-5]. Several *in vitro* and *in vivo* studies reported that CEP inhibited the growth of several types of cancer including, leukemia, lymphoma, lung carcinoma, myeloma, cholangiocarcinoma, oral squamous cell carcinoma, and hepatocellular carcinoma [6-11]. Apoptosis-inducing effect of cepharanthine has been demonstrated through various mechanisms including, down-regulation of anti-apoptotic genes such as Bcl-x1, up-regulation of pro-apoptotic genes such as Bax and activation of caspase-3. CEP was shown to induce cell cycle arrest by up-regulating cell cycle regulators such as cyclin A, cyclin D, cyclin E and p21 [12, 13]. Interestingly, our *in vitro* studies illustrated that CEP could enhance anticancer effect of 5-FU against human colon cancer [14]. Thus, the objectives of this study were to investigate the effect of CEP and 5-FU on human colon cancer in a mouse xenograft model and to identify mechanism(s) underlying the potentiation effect of CEP on anticancer activity of 5-FU.

Materials and Methods

Cell culture

A human colorectal cancer cell line, HT-29, was purchased from American Type Culture Collection (ATCC USA). The cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C in 5% CO₂ incubator.

Animal model

BALB/cMlac-*nu* mice (National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand) were purchased at 4-6 weeks of age and kept under sterile conditions in a pathogen-free environment. The mice were provided with sterile water

and food ad libitum. All animal procedures were performed in accordance with the guideline established by the National Institutes of Health for humane treatment of animals. Animal protocol was approved by Animal Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

BALB/cMlac-nu mice were subcutaneous (s.c.) inoculated with HT-29 cells (1×10^7 cells/mouse) suspended in 100 μ l metrigel (Corning, USA) in the right flank of mice using a 29 - gauge needle (BD, USA). Treatment was initiated when the tumors were approximately 100-150 mm³. The mice were randomly divided into 4 groups and treated with 20 μ l of normal saline, 10 mg/kg of 5-FU (Sigma, USA), 20 mg/kg of CEP (Abcam, UK) and 10 mg/kg of 5-FU in combination with 20 mg/kg of CEP. All animals received drugs by intraperitoneal injection every other day for 3 weeks. Tumor size was measured in two perpendicular diameters using a caliper every other day and tumor volume was calculated based on the following equation: tumor volume (mm³) = $1/2$ [length x (width)²] [15]. At the end of the treatment, mice were sacrificed and the tumors were dissected out and snap-frozen in liquid nitrogen for further study.

Quantitative real-time RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from tumor tissue using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) and mRNA was converted into cDNA using Improm-IITM Reverse Transcription system (Promega, USA). Amplification of target genes was carried out using SYBR Green qPCR super mix universal (Invitrogen, USA) with the specific primers listed in Table 1. GAPDH was used as an internal control. Real-time reactions were run on StepOnePlusTM Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, USA) with the following cycling conditions: 50°C for 2 min, 95 °C for 2 min, and 40 cycles of 95°C for 30s, 60 °C for 30s, and 72°C for 30s. The fold change in gene expression normalized to GAPDH and relative to the expression in vehicle treatment was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Table 1. Sequences of primers used for quantitative real-time RT-PCR

Target Gene	Primer sequences
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'- AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' Reverse: 5'- ATGGCATGGACTGTGGTCATGAGT-3'
<i>BAX</i>	Forward: 5'-GACGAACTGGACAGTAACATG-3' Reverse: 5'-AGGAAGTCCAATGTCCAGCC-3'
<i>BAK</i>	Forward: 5'-AGCTGCCATGGTAATCTAACTCA-3' Reverse: 5'-GATGTGGAGCGAAGGTC-3'
<i>Bcl-2</i>	Forward: 5'-TCATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3' Reverse: 5'-CTACTGCTTTAGTGAACCTTTTGC-3'
<i>Bcl-xl</i>	Forward: 5'-TTGGACAATGGACTGGTTGA-3' Reverse: 5'-GTAGAGTGGATGGTCAGTG-3'

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical analysis of data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni/Dunn post hoc using SPSS statistics 21 software (IBM Corporation, USA). The difference is considered significant if $p \leq 0.05$.

Results

The growth-inhibitory effects of CEP and 5-FU in a colon cancer xenograft model

Previously, we have found that CEP could enhance anticancer effect of 5-FU against colon cancer *in vitro*. In the present study, we therefore evaluated whether CEP can increase the antitumor activity of 5-FU in a colon cancer xenograft mouse model. HT-29 tumor bearing mice were treated with either 5-FU or CEP alone or 5-FU in combination with CEP. As shown in Fig. 1A, the tumor volumes of the 5-FU-treated mice were similar to those of the control group, indicating that 5-FU alone was unable to control the growth of HT-29 tumor. In contrast to 5-FU, CEP alone significantly delayed tumor growth, with respect to the control and 5-FU groups. Remarkably, combination treatment with CEP and 5-FU was more effective in controlling the growth of tumor. At the end of the treatment, the tumor volumes of the combination group were 3 times less than those of the control group. Similarly, the combination treatment significantly decreased the tumor weight by more than half of the control group (Fig. 1B, $p \leq 0.05$). Of note, there were no significant changes in body weight from the baseline in any treatment group (Fig. 1C), suggesting that the single treatment with either 5-FU or CEP alone and the combination treatment of 5-FU and CEP are safe.

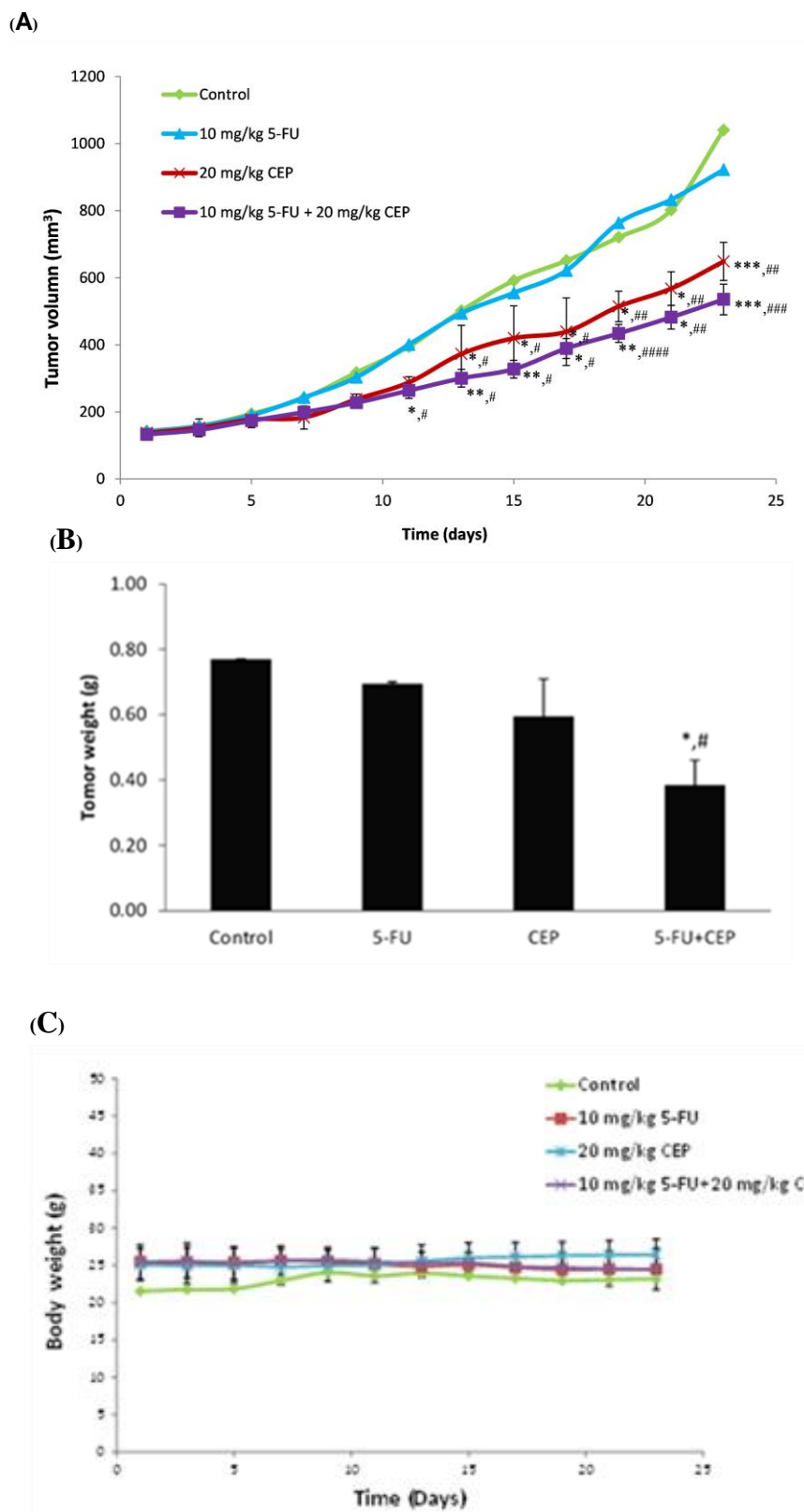


Figure 1 The anticancer effect of 5-FU or CEP alone and 5-FU in combination with CEP in a colon cancer xenografted mouse model. (A) Tumor volume were measured

every other day (B) Tumor weight was determined at the end of experiment and (C) Body weight measured every other day. Results of the control and 5-FU groups were presented as means (n = 2) whereas results of the CEP and combination groups were presented as means \pm SEM (n = 3), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with control and # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ compared with 5-FU.

The effect of CEP and 5-FU on the expression of Bcl-2 family mRNAs in a mouse xenograft model

The levels of pro-apoptosis (Bak and Bax) and anti-apoptosis (Bcl-2 and Bcl-xl) mRNAs were measured by quantitative real-time RT-PCR. As shown in Fig. 2A, CEP alone significantly up-regulated Bak mRNA expression, with respect the control and 5-FU alone groups. Interestingly, the combination treatment of 5-FU and CEP significantly increased mRNA level of Bak, which was approximately 3 times above that of the control group ($p \leq 0.01$). Moreover, the expression of Bak in the treatment of 5-FU combined with CEP was significantly higher than that in the single treatment of with either 5-FU or CEP alone. Similar to Bak, the combination treatment significantly up-regulated the expression of Bax, another pro-apoptotic member of BCL-2 family (Fig. 2B, $p \leq 0.01$). Conversely, there were no significant difference in the expression of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xl mRNAs in any treatment groups (Fig. 2C & D). Taken together, these results suggest that CEP may enhance anti-cancer activity of 5-FU by up-regulating the expression of Bak and Bax.

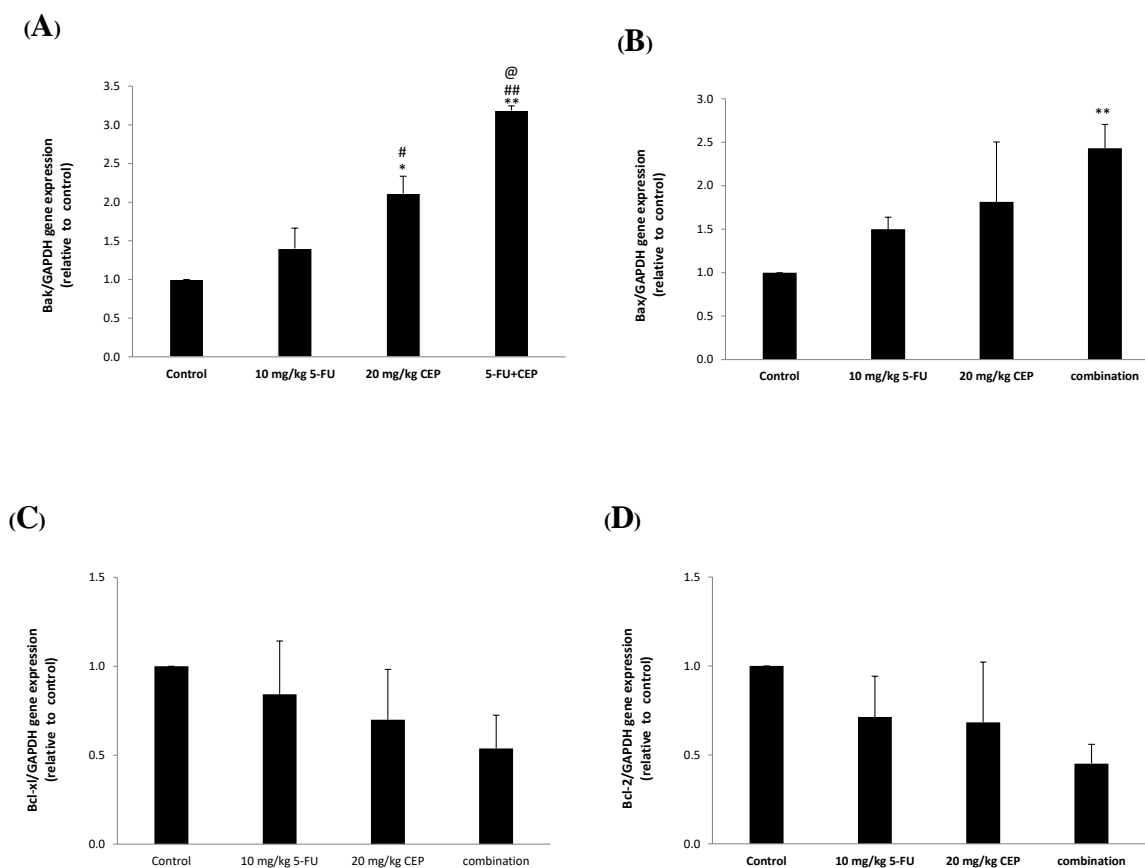


Figure 2 The effect of 5-FU and CEP on the mRNAs expression of (A) Bak, (B) Bax, (C) Bcl-x1, and (D) Bcl-2 in a xenograft mouse model. Results were presented as means \pm SEM (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with 5-FU, @ $p < 0.05$ compared with CEP.

Discussion

We have previously found that CEP increased anticancer effect of 5-FU in colon cancer *in vitro*. In the present study, we examined the effects of CEP alone and in combination with 5-FU in a colon cancer xenograft model. The results showed that CEP alone significantly inhibited the growth of tumor when compared with the control group (Fig. 1 A). Notably, the combination treatment with CEP and 5-FU significantly decreased tumor size and tumor weight, with respect to the treatment with 5-FU, alone. Several studies reported that CEP inhibited tumor growth by inducing apoptosis through up-regulation of pro-apoptotic gene, Bax and down-regulation of anti-apoptotic genes, Bcl-2 and Bcl-x1 in many cancer cells [7, 8, 16]. In the present study, we demonstrated that combination treatment of CEP and 5-FU significantly up-regulated the expression of Bak and Bax mRNA (Fig. 2A & B). Collectively, it is likely that up-regulation of pro-apoptotic regulators, Bak and Bax

are responsible for the synergistic effects of CEP on anticancer activity of 5-FU against human colon cancer.

Conclusion

This study clearly illustrated that treatment with either CEP alone or CEP in combination with 5-FU effectively controlled the growth of colon cancer in a mouse xenograft model. The combination treatment significantly up-regulated the mRNA levels of Bak and Bax. Therefore, this investigation suggests that CEP can potentially be used either alone or in combination with other chemotherapeutic agents for colon cancer treatment.

Acknowledgements

We thank Mr. Intouch Kiatkongla at the Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for expert technical assistance. This study was financially supported by the Ratchadaphiseksompot Endowment Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University (RA57/089) and Special Task Force for Activating Research (STAR), Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University to Overcoming Cancer Drug Resistance Research Group (GSTAR 59-005-30-001).

References

1. Torre, L.A., et al., *Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016. **25**(1): p. 16-27.
2. Miura, K., et al., *5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs*. *Cancers (Basel)*, 2010. **2**(3): p. 1717-30.
3. Bun, S.S., et al., *Cytotoxic activity of alkaloids isolated from *Stephania rotunda* [corrected]*. *Phytother Res*, 2009. **23**(4): p. 587-90.
4. Matsuda, K., et al., *Cepharanthine inhibited HIV-1 cell-cell transmission and cell-free infection via modification of cell membrane fluidity*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014. **24**(9): p. 2115-7.
5. Rogosnitzky, M. and R. Danks, *Therapeutic potential of the biscoclaurine alkaloid, cepharanthine, for a range of clinical conditions*. *Pharmacological Reports*, 2011. **63**(2): p. 337-347.
6. Biswas, K.K., et al., *Cepharanthine triggers apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line (HuH-7) through the activation of JNK1/2 and the downregulation of Akt*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(2): p. 703-10.

7. Harada, K., et al., *Effects of cepharanthine alone and in combination with fluoropyrimidine anticancer agent, S-1, on tumor growth of human oral squamous cell carcinoma xenografts in nude mice*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(4): p. 1263-70.
8. Kikukawa, Y., et al., *Induction of cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells by cepharanthine, a biscoclaurine alkaloid*. *Int J Oncol*, 2008. **33**(4): p. 807-14.
9. Seubwai, W., et al., *Cepharanthine exerts antitumor activity on cholangiocarcinoma by inhibiting NF-kappaB*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(7): p. 1590-5.
10. Takahashi-Makise, N., et al., *Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF-kappaB pathway*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(6): p. 1464-72.
11. Wu, J., et al., *Cepharanthine activates caspases and induces apoptosis in Jurkat and K562 human leukemia cell lines*. *J Cell Biochem*, 2001. **82**(2): p. 200-14.
12. Fang, Z.H., et al., *Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 and cyclooxygenase-2 is involved in radiosensitization of cepharanthine in HeLa cells*. *Int J Gynecol Cancer*, 2013. **23**(4): p. 608-14.
13. Harada, K., et al., *Characteristics of antitumour activity of cepharanthin against a human adenosquamous cell carcinoma cell line*. *Oral Oncol*, 2001. **37**(8): p. 643-51.
14. Unson, S., et al., *"Potentiating effect of cepharanthine in combination with 5fluorouracil on human colorectal cancer cells" The 1st International Conference on Pharmacy Education and Research Network of ASEAN, The Landmark Bangkok Hotel, Bangkok, Thailand. 2-4 December 2015*: p. 58-61.
15. Tomayko, M.M. and C.P. Reynolds, *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989. **24**(3): p. 148-54.
16. Hua, P., et al., *Cepharanthine induces apoptosis through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in human non-small-cell lung cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **460**(2): p. 136-42.

B06

Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 Decreased ROS Production in LPS-Induced Skin Keratinocyte and Macrophage Cells

Furoida Moolsap¹, Supita Tanasawet², Mayuree H. Tantisira³, Wanida Sukketsiri^{1*}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand

²Department of Anatomy, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand

³Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University, Chon Buri Campus, Chon Buri, 20131, Thailand.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are key signaling molecules that play an important role in the progression of inflammatory disorders. An enhanced ROS generation by inflammatory cells at the site of inflammation causes tissue injury. *Centella asiatica* (L.) Urban has been used traditionally in various skin diseases. The aim of this study was to examine effects of the standard extract of *C. asiatica* ECa 233 on lipopolysaccharide (LPS)-induced ROS production in human keratinocytes (HaCaT) and mouse macrophage (RAW264.7) cells. The ROS generation was determined by using dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. The results showed that standard extract of *C. asiatica* ECa 233 (0.1, 1, 10 and 100 µg/mL) significantly decreased the intracellular levels of ROS production similar to those observed in dexamethasone treatment (1 µg/mL) in RAW264.7 cells. Furthermore, ECa 233 (10 and 100 µg/mL) remarkably attenuated the increased ROS levels after induction in HaCaT cells. These results indicate that ECa 233 treatment could alleviate LPS-induced ROS production in both HaCaT and RAW 264.7 cells. Our information regarding the anti-oxidant effect of ECa 233 has provided an incentive to test its therapeutic potential for oxidative stress in the future.

Keywords: ECa 233, HaCaT, RAW264.7, oxidant, dexamethasone

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อี ซี เอ 233 ลดระดับอนุมูลอิสระที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในเซลล์ผิวหนังคีราติโนไซต์และเซลล์แมคโครฟาจ

พวยดา มุลทรัพย์¹, ศุภิตา ธนะเศวตร², มยุรี ตันตีสระวนิดา สุขเกษศิริ³,

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90110

²ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90110

³คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20130

บทคัดย่อ

อนุมูลอิสระของออกซิเจนเป็นสัญญาณระดับ โมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดความผิดปกติของการอักเสบ การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระของออกซิเจนจากเซลล์ก่ออักเสบ ทำให้มีอนุมูลอิสระของออกซิเจนในตำแหน่งที่เกิดการอักเสบเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ บัวบกเป็นพืชที่ใช้ในทางการแพทย์แผนโบราณในการรักษาโรคผิวหนังหลายชนิด การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อี ซี เอ 233 ในเซลล์ผิวหนังคีราติโนไซต์และเซลล์แมคโครฟาจของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจนด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยวัดระดับของอนุมูลอิสระของออกซิเจนด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสารเรืองแสงไดคลอโรฟลูออเรสซินไดอะซิเตต จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก อี ซี เอ 233 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับอนุมูลอิสระของออกซิเจนภายในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับยามาตรฐานเดกซาเมทาโซน (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อี ซี เอ 233 ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับอนุมูลอิสระของออกซิเจนภายในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ผิวหนังคีราติโนไซต์ จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก อี ซี เอ 233 สามารถลดระดับอนุมูลอิสระของออกซิเจนภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจนด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ จากการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของบัวบกซึ่งควรทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: อี ซี เอ 233, เซลล์ผิวหนังคีราติโนไซต์, เซลล์แมคโครฟาจ, อนุมูลอิสระ, เดกซา-เมทาโซน

Introduction

Reactive oxygen species (ROS), including peroxide, superoxide anion and hydroxyl radical as well as reactive nitrogen species (RNS) such as nitric oxide (NO) act as an important biochemical mediators for the pathogenesis of inflammatory disorders. An increased ROS and RNS production cause the reduction of endogenous antioxidants, finally resulting in cell injury and contributing to a number of human diseases such as cancer, degenerative diseases, cardiovascular diseases, diabetes, and aging.¹

Centella asiatica is a medicinal plant in family Apiaceae that has been used as a traditional medicine for the treatment of eczema, psoriasis, and leprosy.² The major compounds are asiaticoside, asiatic acid, madecassoside and madecassic acid.^{3,4} Asiaticoside which is the most abundant triterpene glycoside has the beneficial effect in wound healing.⁵ In addition, the extracts of this plant and its active components possess several pharmacological activities, such as anti-oxidant effect^{6,7,8,9,10,11}, learning and memory improvement¹², decreased lipid peroxidation in the brain.¹³ Thus, this plant was extensively studied which aim to develop as an alternative for several pathological symptoms. The potential effect of *C. asiatica* in antioxidant effect was evaluated both *in vitro* and *in vivo*. Previous studies found that *C. asiatica* attenuated the oxidative stress by increased the anti-oxidant enzyme including superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.^{10,11} The standard extract of *C. asiatica* ECa233, characterized with well-defined ratio of the active ingredients by Tantisira M.H. and collaborates.¹⁴ However, at present there has been little evidence to encourage antioxidative activity of standard extract of *C. asiatica* ECa233. In this study, we investigated the inhibitory effect of a standardized extract of *C. asiatica* ECa 233 on ROS production in lipopolysaccharide (LPS)-induced human keratinocytes (HaCaT) and mouse macrophage (RAW264.7) cells.

Materials and Methods

Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin/ streptomycin were purchased from Gibco BRL Life technologies (Grand Island, NY, USA). 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and dimethylsulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Keratinocyte culture

The standardized *C. asiatica* extract ECa233 was kindly provided from Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D., Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University, was dissolved in a 10% DMSO and treated to cell cultures at

final concentrations of 0.1-100 µg/mL. The DMSO concentration in culture medium was always less than 0.1% (v/v), which was non-toxic to the cells. The standardized extract of *C. asiatica* ECa 233 contains not less than 80% triterpenoids and the ratio between madecassoside and asiaticoside was maintained within 1.5±0.5.⁴ Human keratinocytes (HaCaT) cell line were obtained from CLS Cell Line Service (Heidelberg, Germany) and mouse macrophage (RAW264.7) cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). The cells were maintained in DMEM containing 10% FBS, penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 µg/mL) and 2 mM L-glutamine in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂.

Cytotoxicity of ECa 233 in HaCaT cells

HaCaT were grown in 96-well plate at a density of 1×10⁴ cells/well and incubated for 24 h with the standardized *C. asiatica* extract ECa233 at the concentrations of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 µg/mL. RAW 264.7 cells were exposed with the standardized *C. asiatica* extract ECa233 at the concentrations of 0, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 µg/mL. The MTT assay was used to determine the viability of cells. The 0.5 mg/mL of MTT solution was added and incubated for 2 h at 37 °C. Then, the optical density was determined at 570 nm using a microplate reader (Bio-tex, Highland Park, USA).

Measurement of cell viability in the presence or absence of ECa 233 on LPS induced cells

HaCaT and RAW264.7 cells were cultured in 96-well plates at the density of 5×10⁴ cells/well. After 24 h of incubation, cells were stimulated with LPS in the presence or absence of various concentrations of ECa 233 (0.1, 1, 10 and 100 µg/mL) for 24 h. Dexamethasone (1 µg/mL) was used as a reference drug. The cell viability was determined using MTT assay.

Determination of intracellular ROS production in HaCaT and RAW264.7 cells

Intracellular ROS production in HaCaT and RAW264.7 cells was assayed through the oxidation of DCFH-DA. Briefly, HaCaT and RAW264.7 cells were cultured in 96-well plates at the density of 5×10⁴ cells/well. After 24 h of incubation, cells were stimulated with LPS in the presence or absence of various concentrations of ECa 233 (0.1, 1, 10 and 100 µg/mL) for 24 h. Dexamethasone (1 µg/mL) was used as a reference drug. Then, the cells were washed and exposed to 50 µM of DCFH-DA for 1 h, at 37 °C in dark condition. The fluorescence of DCF was determined using a fluorescence microplate reader (Bio-tex, Highland Park, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. The fluorescence intensity corresponded to the levels of intracellular ROS generated. Intracellular ROS levels were expressed in term of the percentage of the control.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS version 16.0 for Windows software. All data were expressed as mean±SEM. ANOVA was used for testing the differences of the mean values among groups and pairwise comparison between groups was analyzed by LSD post hoc test. Values of $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

Cytotoxicity of the standardized extract *C. asiatica* ECa 233.

In order to evaluate the toxicity of ECa 233, HaCaT cells were exposed with the ECa 233 at the concentrations of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 µg/mL for 24 h. The ECa 233 only at dose of 1,000 µg/mL significantly decreased cell viability to $75.38 \pm 4.90\%$ of the control after 24 h of exposure (Figure 1). In contrast, in RAW 264.7, ECa 233 did not significantly decrease cell viability at concentration up to 1000 µg/mL (Figure 2). Additionally, the cells were treated with 0.1-100 µg/mL ECa 233 revealed non-toxic effects on skin keratinocytes and macrophage cells. Subsequently, 4 non-cytotoxic dosage of ECa 233 were chosen to test the anti-oxidative activity.

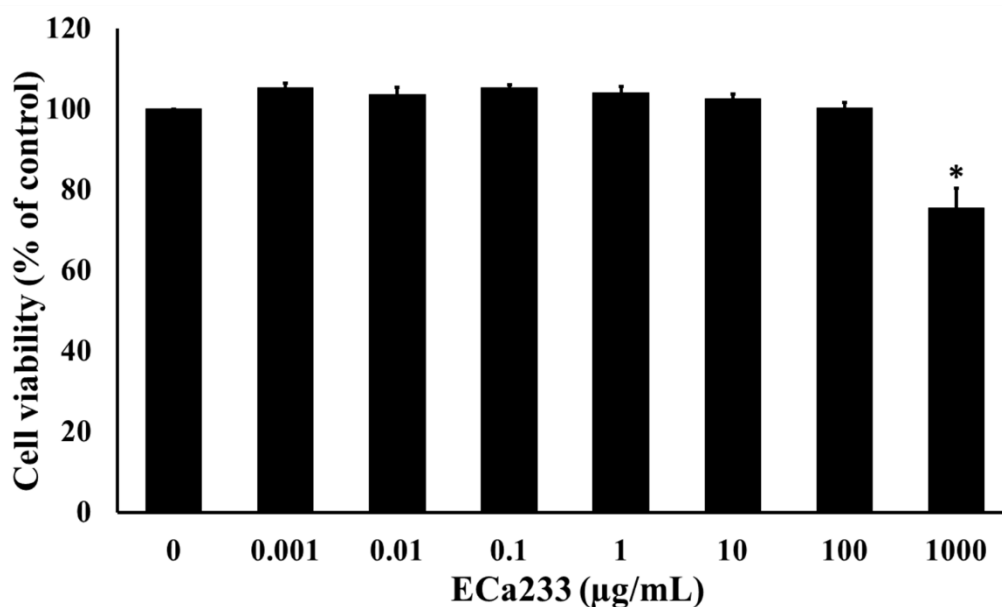


Figure 1. Cytotoxicity effect of the ECa 233 on human skin keratinocyte cells. Cells were exposed to 0.001-1000 µg/mL of ECa 233 for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT assay. The results were presented as a percentage of the control. Data are expressed as the mean ± SEM (n=4). * $P < 0.05$ versus an untreated control (0.1% DMSO).

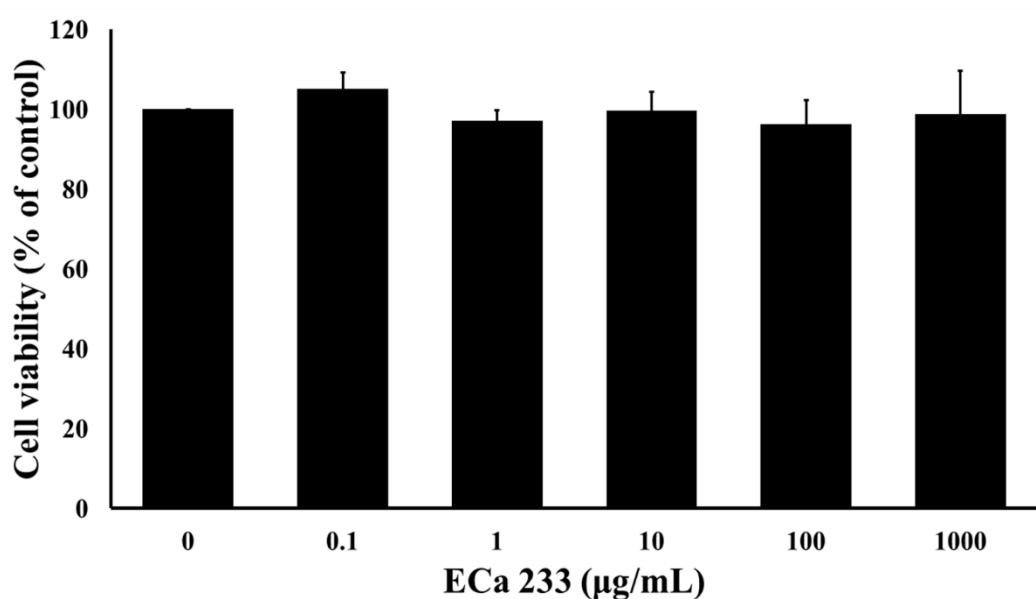


Figure 2. Cytotoxicity effect of the ECa 233 on RAW264.7 macrophage cells. Cells were exposed to 0.1-1000 µg/mL of ECa 233 for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT assay. The results were presented as a percentage of the control. Data are expressed as the mean ± SEM (n=4).

Effect of ECa 233 and dexamethasone on LPS induced ROS production in HaCaT and RAW264.7 cells

In RAW264.7 macrophage cells, LPS (1 µg/mL) significantly increased the generation of ROS to 180.99±28.88% of the control. Treatment with ECa 233 (0.1, 1, 10 and 100 µg/mL) and dexamethasone (1 µg/mL) significantly inhibited the LPS-induced ROS production to 119.31±8.70, 118.56±21.17, 112.43±26.69, 109.36±8.22 and 103.47±19.84% of the control, respectively (Figure 3). As shown in Figure 4, the productions of ROS in HaCaT cells were significantly increased 140.24±23.09 % of the control in response to LPS stimuli. Nevertheless, the ROS production in HaCaT was significantly inhibited by ECa 233 (10 and 100 µg/mL) with 121.16±8.65 and 116.91±1.49% of the control and dexamethasone (1 µg/mL) with 105.24±16.45% of the control. ECa 233 and dexamethasone treatment alone did not apparently alter the generation of ROS in both cell types (Figure 3 and 4).

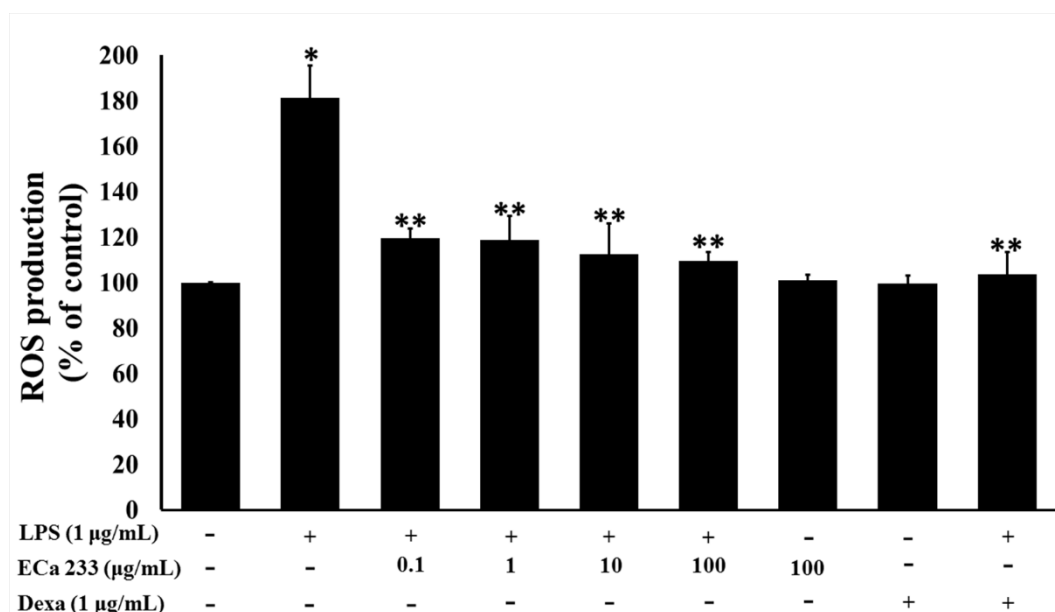


Figure 3. Effect of ECa 233 and dexamethasone on LPS-induced ROS production in RAW264.7 macrophage cells. ROS production was determined by DCFH-DA assay. Data are mean±SEM from four independent experiments. Differences among groups were evaluated by one-way ANOVA followed by LSD post hoc test. * $P < 0.05$ compared with control (0.1% DMSO), ** $P < 0.05$ compared with LPS.

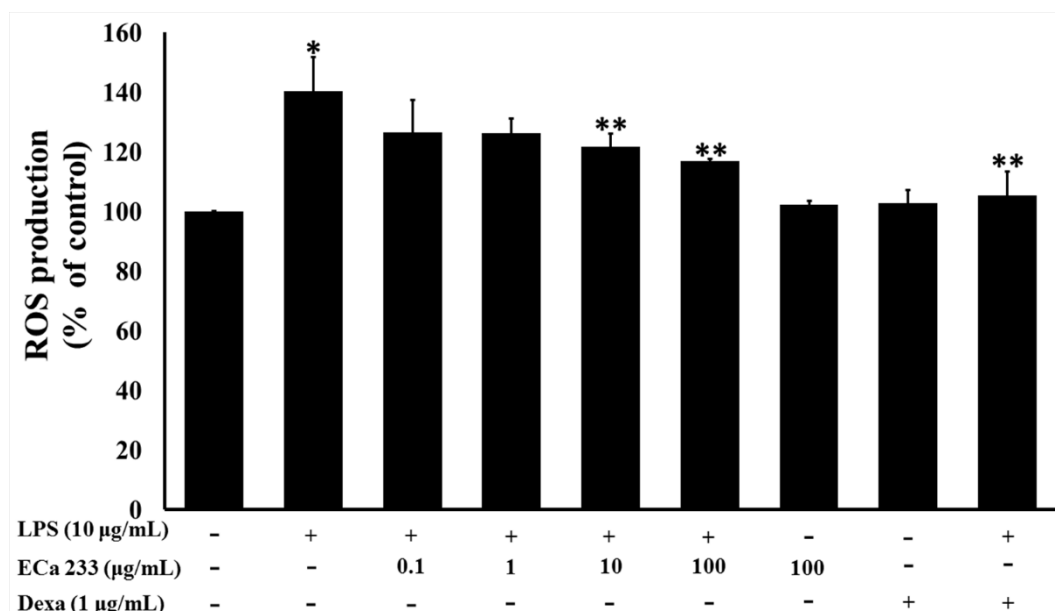


Figure 4. Effect of ECa 233 and dexamethasone on LPS-induced ROS production in HaCaT keratinocyte cells. Data are mean±SEM from four independent experiments. Differences among groups were evaluated by one-way ANOVA followed by LSD post hoc test. * $P < 0.05$ compared with control (0.1% DMSO), ** $P < 0.05$ compared with LPS.

Effect of ECa 233 and dexamethasone on cell viability in LPS induced HaCaT and RAW264.7 cells

After stimulation with LPS in the presence or absence of various concentrations of ECa 233 (0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h in RAW 264.7 and HaCaT cells, it was found that ECa 233 did not evidently affect the viability of RAW264.7 (Figure 5) and HaCaT (Figure 6) cells. The results from this study imply that ROS suppression by ECa 233 and dexamethasone was not due to chemically induced cytotoxicity at any dosage in both cell types.

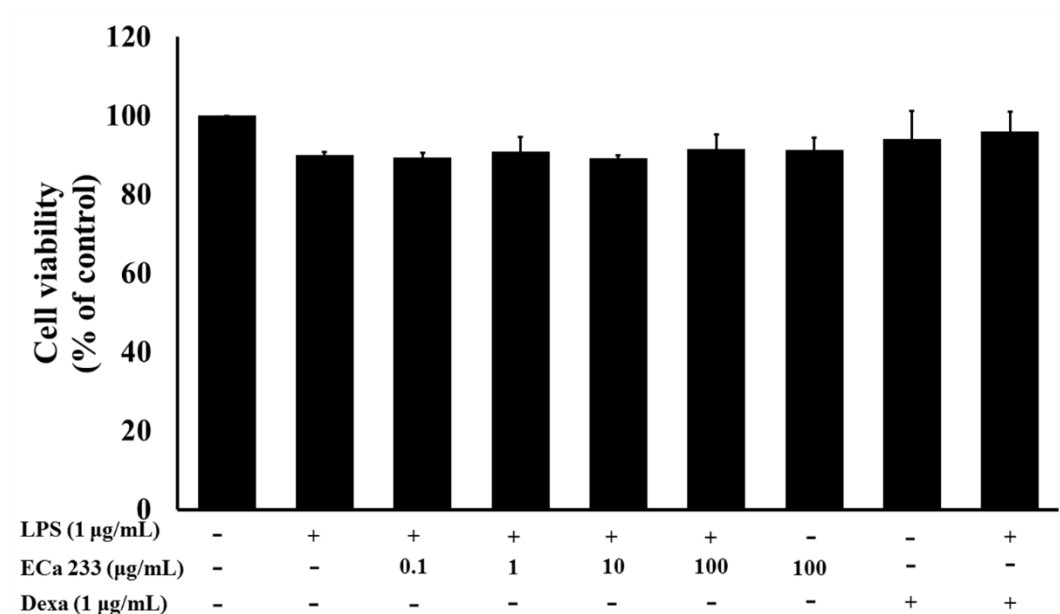


Figure 5. The effect of ECa 233 on cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) in the absence or presence of ECa 233 (0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24. Cell viability was determined by MTT assay. The results were presented as a percentage of the control. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=4).

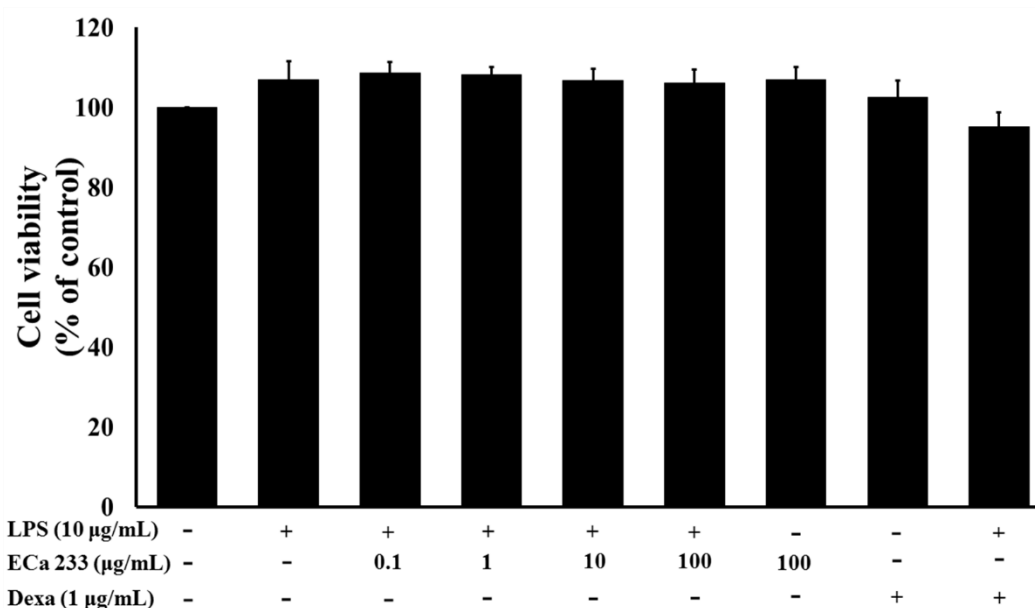


Figure 6. The effect of ECa 233 on cell viability in LPS-induced HaCaT cells. Cells were stimulated with LPS (10 µg/mL) in the absence or presence of ECa 233 (0.1, 1, 10 and 100 µg/mL) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. The results were presented as a percentage of the control. Data are expressed as the mean ± SEM (n=4).

Discussion

Centella asiatica is a source of natural bioactive constituents, triterpenoid saponins, flavonoids, phenolic acids and triterpenic steroids.^{15,16} *C. asiatica* is used in the treatment of dermatological conditions including small wounds, hypertrophic wounds, burns and psoriasis.¹⁷ It was observed that *C. asiatica* extract stimulated the fibroblast proliferation and decreased the formation of stretch marks and inflammatory reactions. Moreover, *C. asiatica* is used as an active compound in skin care because of its antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging activity¹⁸. Our MTT assay showed that ECa 233 (0.1-100 µg/mL) exposure was not reduced cell viability in keratinocytes and macrophage cells. These findings were consistent to the observation found in IMR-32 neuroblastoma cells¹⁹. The imbalance between reactive oxygen species (e.g. superoxide anion, hydrogen peroxide) overproduction and reduction of intracellular antioxidative protection resulted in the damage to cell structures (lipids, proteins, and DNA) which are oxidized and therefore leads to cellular dysfunction and ultimately cell death. Our study indicated that a standardized extract of *C. asiatica* ECa 233 treatment can significantly decrease in the generation of ROS in LPS-induced keratinocytes and macrophage cells which implied that ECa 233 had an anti-oxidative potential. Treatment with dexamethasone produced a significantly decreased level of ROS. These findings were consistent to the observation found in *in vitro* and *in vivo*.^{6,7,8,9} Previous study showed that

administration of *C. asiatica* extract caused a decrease plasma malonaldehyde level in hydrogen peroxide induced oxidative stress in rats.⁹ This may be due to the high content of phenolic and triterpenoid presence in the *C. asiatica* extract. Besides, they are considered as a potent superoxide and hydroxyl radical scavengers and was consistent to previous studies.^{6,7} In addition, *C. asiatica* contains biologically active compounds which prevents and protect the vital organs from oxidative damage.⁹ Furthermore, *C. asiatica* increased the anti-oxidant enzymes, like superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, and anti-oxidants like glutathione.^{10,11} Thus, the finding in this study supported the anti-oxidative role of standardized extract of *C. asiatica* ECa 233.

Conclusion

This study demonstrated that the level of intracellular ROS was significantly decreased in keratinocyte HaCaT and macrophage RAW264.7 cells after treatment with a standardized extract of *C. asiatica* ECa233, indicating antioxidant activity. The cellular mechanisms underlying the anti-inflammatory and antioxidant activity of ECa 233 in both HaCaT keratinocyte and RAW264.7 macrophage cells are needed to be further explored.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from Graduate school, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

References

1. Nation Center for Complementary and Integrative Health (NCCIH). 2016. Antioxidants: In depth. <https://nccih.nih.gov/health/antioxidants/introduction.htm>. (Accessed 11 February 2017)
2. Gohil KJ, Patel JA, Gajjar AK. Pharmacological review on *Centella asiatica*: a potential herbal cure-all. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010; 72(5): 546-556.
3. Ruamsuk N, Pengsuparp T, Jianmongkol S. Potentiative effects of standardized extract of *Centella asiatica* on vinblastine-induced cell death. Thai Journal of Pharmacology. 2010; 32(1):69-71.
4. Wanasuntronwonga A, Tantisirab MH, Tantisirab B, Watanabec H. Anxiolytic effects of standardized extract of *Centella asiatica* (ECa 233) after chronic

- immobilization stress in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 143(2): 579-585.
5. Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan BN. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 65(1): 1-11.
 6. Hamid AA, Shah ZM, Muse R, Mohamed S. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. *Food Chemistry*. 2002; 77(4): 465-469.
 7. Zainol MK, Abd-Hamid A, Yusof S, Muse R. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry*. 2003; 81(4): 575-581.
 8. Pittella F, Dutra RC, Junior DD, Lopes MTP, Barbosa NR. Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *International Journal of Molecular Science*. 2009; 10(9): 3713-3721.
 9. Hussin M, Hamid AA, Mohamad S, Saari N, Ismail M, Bejo MH. Protective effect of *Centella asiatica* extract and powder on oxidative stress in rats. *Food Chemistry*. 2007; 100(2): 535-541.
 10. Jayashree G, Kurup Muraleedhara G, Sudarslal S, Jacob VB. Anti-oxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. *Fitoterapia*. 2003; 74(5): 431-434.
 11. Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2003; 30(5-6): 336-342.
 12. Rao SB, Chetana M, Devi PU. *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. *Physiology & Behavior*. 2005; 86(4): 449-457.
 13. Kumar MHV, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 79(2): 253-260.
 14. Kam-eg A, Tantisira B, Tantisira MH. Preliminary study on effects of a standardized extract of *Centella asiatica*, ECa233, on deficit of learning and memory induced by induced by an intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide in mice. *Thai Journal of Pharmacology*. 2009; 31(1): 79-82.
 15. Hashim P, Sidek H, Helan MH, Sabery A, Palanisamy UD, Ilham M. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules*. 2011; 16(2): 1310-1322.
 16. James J, Dubery I. Identification and quantification of triterpenoid centelloids in *Centella asiatica* by densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography*. 2011; 24(1): 82-87.

17. Bylka W, Znajdek-Awizen P, Studzinska-Sroka E, Danczak-Pazdrowska A, Brzezinska M. *Centella asiatica* in dermatology: an overview. *Phytotherapy Research*. 2014; 28(8): 1117-1124.
18. Li H, Gong X, Zhang L, Zhanga Z, Luo F, Zhou Q, Chen J, Wan J. Madecassoside attenuates inflammatory response on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Phytomedicine*. 2009; 16(6-7): 538-546.
19. Wanakhachornkrai O, Pongrakhananon V, Chunchacha P, Wanasuntronwong A, Vattanajun A, Tantisira B, Chanvorachote P, Tantisira MH. Neuritogenic effect of standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 on human neuroblastoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 13(1): 204.

B07

Anticancer Effects of Piperine-Free *Piper Nigrum* Extract on Cholangiocarcinoma Cells

Araya Khoka¹, Potchanapond Graidist^{2,3}, Somchai Sriwiriyan^{1*}

¹Department of Pharmacology, Prince of Songkla University, Songkhla 90110 Thailand

²Department of Biomedical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla 90110 Thailand

³The Excellent Research Laboratory of Cancer Molecular Biology, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110 Thailand.

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant tumor arising from epithelial cells of biliary tract. CCA is difficult in diagnosis until the patients are at the advanced stage and the treatment is usually ineffective. Resulting in poor prognosis. *Piper nigrum* was used in traditional medicine for various conditions. In this study we focused on piperine free *P. nigrum* extract (PFPE). PFPE has been reported to be effective against breast cancer cells and nitrosomethylurea (NMU) - induced mammary tumorigenesis in rats. Moreover, PFPE showed no acute toxicity in rats during a 14-day observation period. The aim of this present study was to investigate whether PFPE could inhibit cholangiocarcinoma cells, KKU-M213. The cells were treated with PFPE at 0-80 µg/mL for 48 h and cell viability was assessed by MTT assay. The protein expressions of p53, p21, caspase-3 and c-Myc were detected by Western blotting after PFPE treatment at the IC₅₀ concentration for 0-96 h. We found that PFPE inhibited CCA cells proliferation with IC₅₀ of 13.69±1.14 µg/mL. PFPE increased protein levels of p53, p21 and caspase-3 and down-regulated c-Myc. The mechanism of PFPE is suggested to be involved with inhibition of cell cycle and induction of apoptosis. These data provide evidences of anticancer mechanism of PFPE. However, more studies are needed for elucidating the mechanisms on signaling pathway in CCA cells.

Keywords: Anticancer activity, cholangiocarcinoma, cytotoxicity, *Piper nigrum*

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากพริกไทยดำที่ปราศจากพิเพอรินต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เพาะเลี้ยง

อารยา ข้อคำ¹, พจนพร ไกรดิษฐ์^{2,3}, สมชาย ศรีวิริยะจันทร์^{1*}

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

²ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

³ห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศด้านชีวโมเลกุลของมะเร็ง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 90110

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณเยื่อบุเซลล์ท่อน้ำดี มะเร็งชนิดนี้วินิจฉัยได้ยากมักตรวจพบในระยะที่มีความรุนแรงของโรค และการรักษายังไม่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้การพยากรณ์โรคไม่ดี พริกไทยดำเป็นพืชพื้นบ้านที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ หลายชนิด การศึกษานี้ได้นำสารสกัดจากพริกไทยดำที่ปราศจากพิเพอริน (piperine-free *P. nigrum* crude extract; PFPE) มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดี ในการศึกษาที่ผ่านมาเคยมีรายงานว่าสาร PFPE มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง และต้านมะเร็งเต้านมในหนูที่เหนี่ยวนำด้วยสารไนโตรโซเมทิลยูเรีย นอกจากนี้ไม่พบความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูที่ได้รับ PFPE หลังจากติดตามอาการเป็นระยะเวลา 14 วัน การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 ของสาร PFPE การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร PFPE กับเซลล์มะเร็ง KKU-M213 ใช้ความเข้มข้น 0-80 มคก./มล. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยใช้วิธี MTT assay และศึกษาระดับของโปรตีน p53, p21, caspase-3 และ c-Myc ด้วยวิธี Western blotting เมื่อเซลล์ได้รับสาร PFPE ที่ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมง การทดลองพบว่าสาร PFPE สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 13.69±1.14 มคก./มล. และพบระดับของโปรตีน p53, p21 และ caspase-3 เพิ่มขึ้น ส่วนโปรตีน c-Myc มีระดับลดลง ดังนั้น ฤทธิ์ของ PFPE อาจเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวัฏจักรของเซลล์ และเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส ซึ่งข้อมูลจากผลการวิจัยนี้ทำให้เข้าใจกลไกการต้านมะเร็ง อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาในอนาคตเพื่อตรวจสอบผลของสาร PFPE ต่อโมเลกุลโปรตีนอื่นๆ ที่ควบคุมกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

คำสำคัญ: ฤทธิ์การต้านมะเร็ง, มะเร็งท่อน้ำดี, ความเป็นพิษต่อเซลล์, พริกไทยดำ

บทนำ

ปัจจุบันมะเร็งท่อน้ำดีมีอุบัติการณ์การเกิดโรคที่ไม่ลดน้อยลง โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และประเทศเพื่อนบ้านในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าประเทศไทยมีอัตราการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมากที่สุดในโลก¹ มะเร็งท่อน้ำดีมักมีการพยากรณ์โรคไม่ดี วินิจฉัยโรคได้ยากในระยะแรกและตอบสนองต่อการรักษา² ปัจจัยเสี่ยงในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่พบได้มากที่สุด ในไทยคือ การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ¹ ซึ่งส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังของเซลล์ท่อน้ำดี มีการหลั่งสารต่างๆ เช่น interleukin-6 และ cyclooxygenase-2 เป็นต้น เกิดการซ่อมแซมแผลบ่อยๆ จนเซลล์ปกติเปลี่ยนไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในที่สุด^{1,3} และยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่นๆในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซี^{4,5} การดื่มแอลกอฮอล์และนิ่วในท่อน้ำดี⁶ เป็นต้น สำหรับการรักษาประกอบด้วยการผ่าตัด เคมีบำบัดและรังสีรักษา ซึ่งเคมีบำบัดมักทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปากแห้ง เบื่ออาหาร ผอมลง ติดเชื้อง่าย ซีด และเลือดออกง่าย เป็นต้น⁷ ทำให้ผู้ป่วยเกิดความไม่สุขสบาย บางรายเกิดภาวะทางจิตใจ ซึมเศร้า ท้อแท้ สิ้นหวังต่อการรักษาหรือผู้ป่วยบางรายคือต่อยาเคมีบำบัดซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีในปัจจุบัน

พริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านของไทย ประกอบด้วยสารสำคัญ เช่น อัลคาลอยด์ ลิกแนน และเทอร์ปีน เป็นต้น⁸ พริกไทยดำมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ด้านอาการท้องเสีย ด้านหอบหืด ด้านการอักเสบ ป้องกันโรคหัวใจ และหลอดเลือด เป็นต้น⁹ สารพิเพอรินเป็นอัลคาลอยด์ที่พบมากที่สุดที่พริกไทยดำ แต่เคยมีการศึกษาพบว่า เมื่อให้สารพิเพอรินกับหนูทดลองจะมีความเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ม้าม ต่อมไทมัส ต่อมน้ำเหลือง¹⁰ และเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ของหนู¹¹ ในการศึกษาที่สนใจฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดหยาบจากพริกไทยดำที่ปราศจากพิเพอริน (piperine free *P. nigrum* extract; PFPE) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า PFPE มีฤทธิ์ป้องกันและต้านมะเร็งเต้านมทั้งในสัตว์ทดลอง และเซลล์มะเร็งเต้านมโดยการศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7, MDA-MB-468 และ MDA-MB-231 พบว่า PFPE มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยมีค่า IC₅₀ ประมาณ 7.45, 18.19 และ 21.68 มก./มล. ตามลำดับ แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เต้านมปกติ (MCF-12A) ต่ำ โดยมีค่า IC₅₀ ประมาณ 48.07 มก./มล.¹² ส่วนฤทธิ์ในการป้องกัน และต้านมะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อให้ PFPE ในหนูที่ชักนำให้เป็นมะเร็งเต้านมด้วยไนโตรโซเมทิลยูเรีย มีผลให้ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กลงโดย PFPE ออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลโดยการเพิ่มโปรตีน p53 และ cytochrome c มีผลลดโปรตีน c-Myc, topoisomerase II, estrogen receptor, E-cadherin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2 และ -9^{13,14} อีกทั้งพบว่าเมื่อให้ PFPE ปริมาณ 5,000 มก./กก. แก่หนูทดลองไม่พบพิษเฉียบพลันแต่อย่างใด¹⁴ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลของ PFPE ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นการศึกษาวินิจฉัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของ PFPE ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีรวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล-เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการศึกษาในสัตว์ทดลองในการพัฒนาเป็นยาใหม่ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

การสกัดสาร PFPE จากพริกไทยดำ (*P.nigrum*)

นำเมล็ดพริกไทยดำมาบดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และนำไปต้มในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบพริกไทยดำ (*P. nigrum* crude extract) ซึ่งเป็นสารคล้ายน้ำมันสีน้ำตาล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำ recrystallization โดยใช้อีเทอร์ที่เย็นเต็มลงในสารสกัด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมากรองเพื่อแยกเอาผลึกสีเหลืองซึ่งเป็นผลึกของฟิเพอรินออก นำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สาร PFPE¹²

การเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213

เลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213 ด้วยอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี penicillin ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มล., streptomycin ความเข้มข้น 100 มก./มล., 10% fetal bovine serum และ 1% L-gluta mine โดยเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay

เลี้ยงเซลล์ KKU-M213 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วยสาร PFPE ฟิเพอริน และสารสกัดหยาบพริกไทยดำ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-80 มก./มล. โดยมีกลุ่มควบคุมแบบบวกเป็น doxorubicin ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-10 ไมโครโมลาร์ และนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. นำไปต้มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาที ตูดสารละลาย MTT ออกแล้วจึงเติม DMSO และบ่มเซลล์เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ตะกอน formazan ละลายนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 และ 650 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต และหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) โดยใช้โปรแกรม SoftMax[®] Pro 5 (MDS Analytical Technologies Inc., California, USA)

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน c-Myc, p21, p53 และ caspase-3 ด้วยวิธี Western blot analysis

เก็บเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีหลังให้สาร PFPE ที่ความเข้มข้น IC₅₀ (ซึ่งได้จาก MTT assay) ที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชม. และสกัดโปรตีนจากเซลล์แล้วนำไปแยกโดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นย้ายโปรตีนลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส ทำการ block ด้วย 5% non-fat milk จากนั้นบ่มด้วย primary antibody

ที่จำเพาะต่อโปรตีน c-Myc, p21, p53, caspase-3 และ GAPDH (internal control) และบ่มด้วย secondary antibody และนำไปประกบฟิล์มเพื่อดูโปรตีน โดยการศึกษาการแสดงผลของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis จะทำซ้ำมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ครั้ง (independent experiments)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่า IC₅₀ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มที่ได้รับ PFPE กับพิเพอริน และกลุ่มที่ได้รับ PFPE กับสารสกัดหยาดจากพริกไทยดำ โดยใช้ t-test หาก p-value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

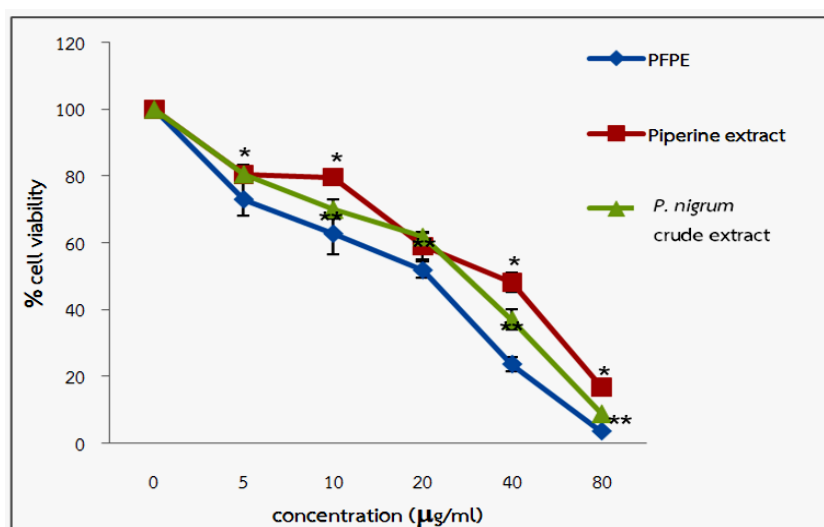
ผลการทดลอง

ฤทธิ์ของสาร PFPE ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213

เมื่อให้สาร PFPE กับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 เป็นเวลา 48 ชม. พบว่ามีค่า IC₅₀ เท่ากับ 13.69±1.14 มคก./มล. (ตารางที่ 1) ทั้งนี้ U.S. National Cancer Institute (NCI) plant screening program ได้กล่าวไว้ว่า สารสกัดหยาดจากพืชใดๆ ก็ตาม ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ควรมีค่า IC₅₀ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 มคก./มล.¹⁵ ซึ่งถือว่าสาร PFPE สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ ส่วนสารสกัดหยาดจากพริกไทยดำ ซึ่งมีสารพิเพอรินเป็นองค์ประกอบอยู่ และพิเพอริน มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 22.24± 0.25 และ 27.01± 0.36 มคก./มล. ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า PFPE มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 ได้มากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาดพริกไทยดำ ในขณะที่พิเพอรินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีน้อยที่สุดโดยฤทธิ์ดังกล่าวขึ้นกับความเข้มข้นของสาร (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า IC₅₀ ของสารจากพริกไทยดำ และยาเคมีบำบัดที่มีผลต่อเซลล์ KKU-M213

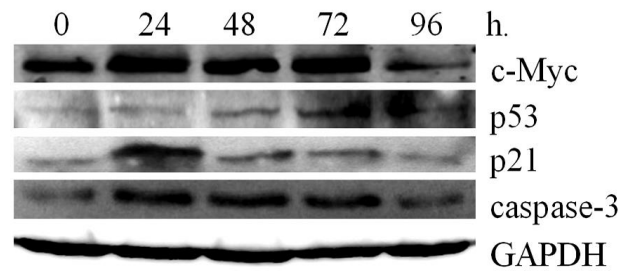
Compounds	IC ₅₀ (mean ± SD)
PFPE	13.69± 1.14 µg/ml
<i>P. nigrum</i> crude extract	22.24± 0.25 µg/ml
Piperine extract	27.01± 0.36 µg/ml
Doxorubicin	1.74 ± 0.02 µM



รูปที่ 1 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 เมื่อได้รับสารสกัดจากพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 มก./มล.เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (* p -value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับ piperine extract กับ PFPE และ ** p -value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับ *P. nigrum* crude extract กับ PFPE)

ฤทธิ์ของสาร PFPE ต่อระดับของโปรตีน *c-Myc*, *p21*, *p53* และ *caspase-3* ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213

หลังจากบ่มเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 ด้วยสาร PFPE ที่ความเข้มข้น 13.69 มก./มล. (ซึ่งเป็นค่า IC_{50}) เป็นเวลา 0-96 ชม. และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี Western blot analysis พบว่าสาร PFPE สามารถเพิ่มระดับของโปรตีน *p53*, *p21*, *caspase-3* โดยระดับของโปรตีน *p21* เพิ่มสูงสุดที่เวลา 24 ชม. ระดับของโปรตีน *caspase-3* เพิ่มขึ้นที่เวลา 24-72 ชม. ส่วนระดับโปรตีน *p53* เพิ่มขึ้นที่ 72 ชม. ในขณะที่ระดับของโปรตีน *c-Myc* ลดลง เมื่อได้รับสารนาน 96 ชม. โดยมี GAPDH เป็นโปรตีนควบคุมปริมาณ (รูปที่ 2) จะเห็นได้ว่าสาร PFPE สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 ได้



รูปที่ 2 ระดับของโปรตีน c-myc, p53, p21 และ caspase-3 เมื่อได้รับสาร PFPE ที่ความเข้มข้น 13.69 มก./มล. เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชม.

วิจารณ์

การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในขณะที่การรักษายังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอผู้ป่วยมักกลับเป็นซ้ำในระยะเวลา 5 ปีหลังการรักษา¹⁶ ดังนั้นสมุนไพรพื้นบ้านอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษา มีการรายงานว่ามีพืชในตระกูล *Piper* หลายชนิดสามารถต้านมะเร็งได้ เช่น *Piper sarmentosum* ต้านมะเร็งตับ¹⁷ *Piper longum* ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งตับอ่อน¹⁸ *Piper chaba* ต้านมะเร็งตับ และมะเร็งท่อน้ำดี¹⁹ แต่ยังไม่มีการศึกษา *Piper nigrum* ในมะเร็งท่อน้ำดี การศึกษานี้จึงได้นำสารสกัดจากพริกไทยดำ ได้แก่ สารพิเพอริน สารสกัดหยาบจากพริกไทยดำ และ PFPE มาทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งพิเพอรินเป็นสารประกอบหลักที่สกัดได้จากพริกไทยดำ⁹ แต่เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากพริกไทยดำ และ PFPE จึงได้นำพิเพอรินออกจากสารสกัดหยาบพริกไทยดำได้เป็น PFPE ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าสาร PFPE มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมทั้งในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงและมะเร็งเต้านมในหนูที่เหนี่ยวนำด้วยไนโตรโซเมทิลยูเรีย^{12,14}

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของ PFPE ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213 พบว่ามีค่า IC_{50} 13.69±1.14 มก./มล. เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า PFPE มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 ด้วย IC_{50} 7.45±1.59 มก./มล.^{12,14} ในขณะที่สารสกัดจากพืชในตระกูล *Piper* อื่น เช่น *P. chaba* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงชนิด CL-6 ด้วยค่า IC_{50} 50.62 ± 3.10 มก./มล.¹⁹ จะเห็นได้ว่า PFPE ที่ได้จาก *P. nigrum* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 ค่อนข้างสูง ส่วนสารสกัดจาก *P. chaba* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด CL-6 ต่ำ ทั้งนี้ความแตกต่างข้างต้นอาจขึ้นอยู่กับคุณสมบัติ และการตอบสนองของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ต่างชนิดกัน หรือองค์ประกอบของสารบางอย่างในพืชตระกูล *Piper* ที่ต่างกัน

เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสาร PFPE ต่อการต้านเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

น้ำดีชนิด KKU-M213 พบว่าสาร PFPE เหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน p53, p21 และ caspase-3 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ส่งผลให้หยุดวัฏจักรเซลล์ และเกิดการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี การเพิ่มขึ้นของ p53 ทำหน้าที่เป็น transcription factor กระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน p21^{20,21} โดย p21 ยับยั้งการทำงานของ cyclin และ CDK²¹ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งหยุดการแบ่งตัว นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของ p53 มีผลไปกระตุ้นการทำงานของ Bax ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ รวมทั้ง caspase-3²² ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบอะพอโทซิส

การลดลงของระดับโปรตีน c-Myc เมื่อได้รับสาร PFPE มีผลต่อการแบ่งตัว และการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจาก c-Myc เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดภายในเซลล์ เช่น กระตุ้นการทำงานของ CDK, cyclin D1 ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตหรือ c-Myc ยับยั้งการทำงานของ p21²³ ส่งผลให้วัฏจักรเซลล์ดำเนินต่อไป ดังนั้นเมื่อระดับของโปรตีน c-Myc ลดลงหลังจากได้รับสาร PFPE ผลคือการทำงานของ CDK, cyclin D1 ลดลง ในขณะที่การทำงานของ p21 เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์มะเร็งหยุดการแบ่งตัว และเกิดการตายของเซลล์มะเร็งในที่สุด

กระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในระดับโมเลกุลเกี่ยวข้องกับระดับโปรตีนหลายชนิดภายในเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ เช่น มีการทำงานของ tumor suppressor gene ลดลงส่งผลให้ระดับโปรตีน p53 และ p21 ลดลง หรือมีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน Akt, c-Myc, cyclin, STAT-3, COX-2 และ NF- κ B เป็นต้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีระดับโมเลกุลของสาร PFPE พบว่าระดับของโปรตีน p53, p21 และ caspase-3 เพิ่มขึ้น ในขณะที่ c-Myc ลดลง ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานเกี่ยวกับกลไกต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น curcumin จากขมิ้น พบว่าสารยับยั้งการเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M156 โดยมีการเพิ่มขึ้นของ cleaved caspase-3, -8, -9, death receptor 4, 5 มีการลดลงของ Bcl-2, Bcl-XL, C-FLIP, survivin, cyclin D1, c-Myc²⁴ นอกจากนี้สาร curcumin ยังลดระดับโปรตีน cyclin D1 และเพิ่ม cleaved PARP ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด SG-231 และ CCLP-1²⁵ สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 เกิดการตายโดยสารยับยั้ง topoisomerase II α เพิ่มระดับ cleaved PARP-1, Bax และ p53 นอกจากนี้ยังหยุดวัฏจักรของเซลล์โดยการลดโปรตีน CDK6 และ cyclin D1²⁶ เมื่อศึกษาโครงสร้างของสารพบว่า curcumin เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล²⁵ สารจากฟ้าทะลายโจรเป็นไดเทอร์ปีนแลคโตน²⁶ PFPE ซึ่งเป็นสารสกัดหลายประกอบด้วย อัลคาลอยด์ เทอร์ปีน ฟีนอลิก เทนิน เป็นต้น⁸ จะเห็นได้ว่าสารจากพืชสมุนไพรหลายชนิดมีโครงสร้างบางอย่างที่เหมือนกัน ดังนั้นพืชแต่ละชนิดจึงมีกลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีที่คล้ายกัน

สรุป

จากผลการศึกษารูปได้ว่าสาร PFPE สามารถต้านเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-M213 โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัว และกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ จากระดับของโปรตีน p53, p21 และ caspase-3 ที่เพิ่มขึ้น และระดับของ c-Myc ที่ลดลงซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาโมเลกุลของโปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2560 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป และทุนจากห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศด้านชีวโมเลกุลของมะเร็ง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ExLab004)

เอกสารอ้างอิง

1. Sripa B, Brindley PJ, Mulvenna J, Laha T, Smout MJ, Mairiang E, et al. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*-multiple pathways to cancer. Trends Parasitol. 2012;28(10):395-407.
2. Kaewpitoon N, Kaewpitoon SJ, Pengsaa P, Sripa B. *Opisthorchis viverrini*: The carcinogenic human liver fluke. World J Gastroenterol WJG. 2008;14(5): 666-74.
3. Zeekpudsa P, Kukongviriyapan V, Senggunprai L, Sripa B, Prawan A. Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma to chemotherapeutic agents. J Exp Clin Cancer Res CR. 2014;33:11.
4. Onal IK, Parlak E, Kekilli M, Kurt M, Alioglu H, Disibeyaz S, et al. Hepatitis B and C Virus Infection and Cholangiocarcinoma: A Case-Control Study in Turkey. Hepatit B Ve C Virüs Enfeksiyonu Bir Vaka-Kontrol Çalışması. 2012; 22(3):187-91.
5. Li H, Hu B, Zhou Z-Q, Guan J, Zhang Z-Y, Zhou G-W. Hepatitis C virus infection and the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma. World J Surg Oncol. 2015;13:161.
6. Plentz RR, Malek NP. Clinical presentation, risk factors and staging systems of cholangiocarcinoma. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2015;29(2):245-52.
7. UK CR. Types of treatment for bile duct cancer [Internet]. 2015 [cited 2016 Jun 7]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/bile-duct-cancer/bile-duct-cancer-treatment/types-treatment-bile-duct-cancer>

8. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. 1997;46(4):597-673.
9. Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Farooq S, Ali M, Khan MA. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2(3 SUPPL.):S1945-53.
10. Dogra RKS, Khanna S, Shanker R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. *Toxicology*. 2004;196(3):229-36.
11. Daware MB, Mujumdar AM, Ghaskadbi S. Reproductive toxicity of piperine in Swiss albino mice. *Planta Med*. 2000;66(3):231-6.
12. Sriwiriyajan S, Ninpesh T, Sukpondma Y, Nasomyon T, Graidist P. Cytotoxicity Screening of Plants of Genus *Piper* in Breast Cancer Cell Lines. *Trop J Pharm Res*. 2014;13(6):921-8.
13. Deng Y, Sriwiriyajan S, Tedasen A, Hiransai P, Graidist P. Anti-cancer effects of *Piper nigrum* via inducing multiple molecular signaling *in vivo* and *in vitro*. *J Ethnopharmacol*. 2016;188:87-95.
14. Sriwiriyajan S, Tedasen A, Lailerd N, Boonyaphiphat P, Nitiruangjarat A, Deng Y, et al. Anticancer and Cancer Prevention Effects of Piperine-Free *Piper nigrum* Extract on N-nitrosomethylurea-Induced Mammary Tumorigenesis in Rats. *Cancer Prev Res Phila Pa*. 2016;9(1):74-82.
15. Geran R. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (3rd ed.). *Cancer Chemother Rep*. 1972;3:51-61.
16. Wu Z-F, Wu X-Y, Zhu N, Xu Z, Li W-S, Zhang H-B, et al. Prognosis after resection for hepatitis B virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol WJG*. 2015;21(3):935-43.
17. Zainal Ariffin SH, Wan Omar WHH, Zainal Ariffin Z, Safian MF, Senafi S, Megat Abdul Wahab R. Intrinsic anticarcinogenic effects of *Piper sarmentosum* ethanolic extract on a human hepatoma cell line. *Cancer Cell Int*. 2009;9:6.
18. Ovadje P, Ma D, Tremblay P, Roma A, Steckle M, Guerrero J-A, et al. Evaluation of the efficacy & biochemical mechanism of cell death induction by *Piper longum* extract selectively in *in-vitro* and *in-vivo* models of human cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(11):e113250.
19. Mahavorasirikul W, Viyanant V, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:55.
20. Allen MA, Andrysiak Z, Dengler VL, Mellert HS, Guarnieri A, Freeman JA, et al. Global analysis of p53-regulated transcription identifies its direct targets and unexpected regulatory mechanisms. *eLife*. 2014;3:e02200.

21. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(6):400-14.
22. Mondal S, Bhattacharya K, Mallick A, Sangwan R, Mandal C. Bak Compensated for Bax in p53- null Cells to Release Cytochrome c for the Initiation of Mitochondrial Signaling during Withanolide D-Induced Apoptosis. *PLOS ONE*. 2012;7(3):e34277.
23. Wang Z, Liu M, Zhu H, Zhang W, He S, Hu C, et al. Suppression of p21 by c-Myc through members of miR-17 family at the post-transcriptional level. *Int J Oncol*. 2010;37(5):1315-21.
24. Prakobwong S, Gupta SC, Kim JH, Sung B, Pinlaor P, Hiraku Y, et al. Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Carcinogenesis*. 2011;32(9):1372-80.
25. Koprowski S, Sokolowski K, Kunnimalaiyaan S, Gamblin TC, Kunnimalaiyaan M. Curcumin-mediated regulation of Notch1/hairy and enhancer of split-1/survivin: molecular targeting in cholangiocarcinoma. *J Surg Res*. 2015; 198(2):434-40.
26. Nateewattana J, Dutta S, Reabroi S, Saeeng R, Kasemsook S, Chairoungdua A, et al. Induction of apoptosis in cholangiocarcinoma by an andrographolide analogue is mediated through topoisomerase II alpha inhibition. *Eur J Pharmacol*. 2014;723:148-55.

B08**Iron Distribution and Iron Deposition in the Bone of β -Thalassemic Mice and a Preliminary Study of the Effect of Iron Chelator Deferiprone****Scarlett Shanika Desclaux^{*1}, Paranee Yatmark², Noppawan Phumala Morales¹, Urai Chaisri³, Saovaros Svasti⁴, Warinkarn Hemstapat¹**¹*Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*²*Department of Pre-Clinical and Apply Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand*³*Department of Tropical Pathology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*⁴*Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand***Abstract**

Ineffective erythropoiesis and iron overload are evidenced to be the causes of osteoporosis in β -thalassemia patients. Particularly, the excessive iron deposition in vital organs often leads to morbidity and mortality in patients with thalassemia. However, little is known about the iron distribution and deposit in the bone and joints of patients with β -thalassemia as well as the effectiveness of iron chelator in removing iron deposits from the bone. Therefore, the present study aimed to investigate these by evaluating bone mineral density (BMD) and iron distribution and iron deposits in the leg bones including femur, tibia and the knee joint of iron overloaded β -globin knockout (BKO) thalassemic mice. The results showed that BMD was not affected by the disease and the iron overload condition. Moreover, it was observed that iron accumulated in the bone marrow, compact bone, and trabecular bone of iron overloaded BKO mice, as well as in the cells found in the surface of bone. However, after treatment with deferiprone (L1), less accumulation of iron was observed in these areas, suggesting that L1 may be effective in removing iron in the bone.

Keywords: Ineffective erythropoiesis, iron overload, osteoporosis, β -thalassemia, deferiprone

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการกระจายตัวและการสะสมของเหล็กในกระดูกของหนู ถีบจักรที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดเบต้าและผลของยาขับเหล็กดีเฟอริโพรน

สกาแลท ชนิกา เกล็คโรซ¹, ปารณีย์ ญาติมา², นพวรรณ ภูมามาลา มอราเลส¹, อุไร ไชยศรี³,
เสาวรส สวัสดิ์วัฒน์⁴, วรินกาญจน์ เหมสถาปัตย์¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

²ภาควิชาปริคณินและสัตวศาสตร์ประยุกต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม
73170

³ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

⁴ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

การสร้างเม็ดเลือดอย่างไม่มีประสิทธิภาพและภาวะเหล็กเกินเป็นสาเหตุของโรคกระดูกพรุนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสะสมของเหล็กที่มากเกินไปในอวัยวะสำคัญของร่างกาย อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในผู้ป่วยและการเสียชีวิต อย่างไรก็ตามในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาถึงการกระจายตัวและการสะสมของเหล็กในกระดูก รวมถึงประสิทธิภาพของยาขับเหล็กในการดึงเหล็กออกจากกระดูกและข้อต่อในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต่ายังมีน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาหัวข้อดังกล่าว โดยประเมินความหนาแน่นของกระดูก รวมทั้งศึกษาการกระจายตัวและการสะสมของเหล็กในกระดูกขาท่อนบน ท่อนล่างและที่ข้อเท้าในหนูถีบจักรที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดเบต้า หลังจากให้ยาขับเหล็กดีเฟอริโพรน จากผลการทดลองไม่พบความเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของกระดูกในสัตว์ทดลองทั้งจากภาวะของโรคเองและภาวะที่ได้รับเหล็กเกิน แต่พบว่าการสะสมของเหล็กที่บริเวณไขกระดูก กระดูกแข็ง และ กระดูกโปร่ง รวมทั้งเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณผิวกระดูกในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มที่ได้รับยาขับเหล็กดีเฟอริโพรนมีการสะสมของเหล็กในบริเวณเหล่านี้ลดลง แสดงให้เห็นว่าดีเฟอริโพรนอาจมีประสิทธิภาพในการลดการสะสมเหล็กในกระดูกได้

คำสำคัญ: การสร้างเม็ดเลือดไม่มีประสิทธิภาพ, ภาวะเหล็กเกิน, โรคกระดูกพรุน, ธาลัสซีเมียชนิดเบต้า, ดีเฟอริโพรน

Introduction

Ineffective erythropoiesis and iron overload are the causes of osteoporosis in β -thalassemia patients. Osteoporosis caused by ineffective erythropoiesis may be due to dramatic bone marrow expansion which interrupts bone formation.

An excess accumulation of iron in multiple organs, especially in bone and joints, can result in osteopenia and osteoporosis. Several studies have shown that there was a decrease in bone mineral density and deterioration in the bone microarchitecture in the iron overloaded mice^{1,2} and in patients presenting with iron overload³. Moreover, arthropathy has also been investigated in iron overloaded patients with β -thalassemia who were found to have iron deposit in both knees of these patients⁴.

Since the excessive iron deposition in many organs are known to be the cause of morbidity and mortality in patients with thalassemia, iron chelators are required to reduce iron deposition in these patients⁵. Although several studies have been investigated the effectiveness of iron chelators in multiple vital organs of β -thalassemic mice as well as iron overloaded mice models. Little is known about the iron distribution and accumulation in the bone as well as the effectiveness of iron chelators in removing iron deposits from the bone and joints of patients with β -thalassemia. Therefore, the present study aimed to investigate this by using the β -globin knockout (BKO) mice as a model of human β -thalassemia intermedia.

Materials and Methods

Seven-week-old wild type C57BL/6J mice (WT) were used as a WT control group. The heterozygous β -globin knockout (BKO) mice ($Hbb^{th-3/+}$, BKO) weighing 17-25 g were randomly divided into 3 groups ($n=5$), *i.e.*, BKO normal control (N), iron overloaded (I), and iron chelator-treated groups (deferiprone; L1). BKO normal control group was intraperitoneally loaded with saline whereas iron overloaded group was intraperitoneally loaded with 20 mg (1 dose) iron dextran per mouse once daily, total 180 mg (9 doses) of iron dextran/mouse during 2 weeks⁶. The mice with iron chelator-treated group was intraperitoneally treated with L1 0.6 μ mol (80 μ g)/g body weight for 7 days starting 3 days after receiving the final dose of iron dextran injection. The mice were euthanized 24 h after iron chelator administration⁷. Both left and right legs were finally collected for X-ray and histological analyses. Experimental protocol (Protocol No. MUSC60-003-353) was approved by the Animal Ethics Committee at the Faculty of Science, Mahidol University of Thailand.

X-ray is a two-dimensional technique for assessment of bone mineral density (BMD) change. One leg of mouse from each group was scanned and then deterioration in the trabecular architecture was analyzed from X-ray image by using image J Ver.1.47i. software (The National Institutes of Health, Maryland, United

States). Each pixel from X-ray image was analyzed at the grayscale level and eventually a histogram was created. Integrated pixel value from the histogram was then recorded.

Leg bone was fixed in 4% paraformaldehyde, 5% sucrose in 150 mmol/L PBS, pH 7.4 for 24-48 h, decalcified with 10% EDTA for 2 weeks and embedded in paraffin. The sagittal sections of the leg bone were stained for histological examination and for investigating iron deposition using hematoxylin and eosin (H&E), and Perl's Prussian blue, respectively. The Perl's Prussian stained digital images were obtained by using a fluorescence microscope (Olympus BX53, Olympus, Tokyo, Japan) and the semi-quantitative analysis of iron deposit in the trabecular and compact bone were performed using image J Ver.1.47i software (The National Institutes of Health, Maryland, United States).

Results and Discussion

The analysis of X-ray images showed that no significant difference in integrated pixel value of distal femur and proximal tibia was observed in any investigated groups (Figure 1), suggesting that BMD was not affected by the disease and the iron overload condition. Although X-ray can be used to assess BMD⁸, in the present study was unable to detect the changes in BMD by using this technique. This may be due to the insensitivity of this technique, in which it is required approximately 20-40% of bone loss for accurately detected⁹. Therefore, further study using Micro-CT, a three-dimensional technique, which has better sensitivity than X-ray method is required for quantifying BMD.

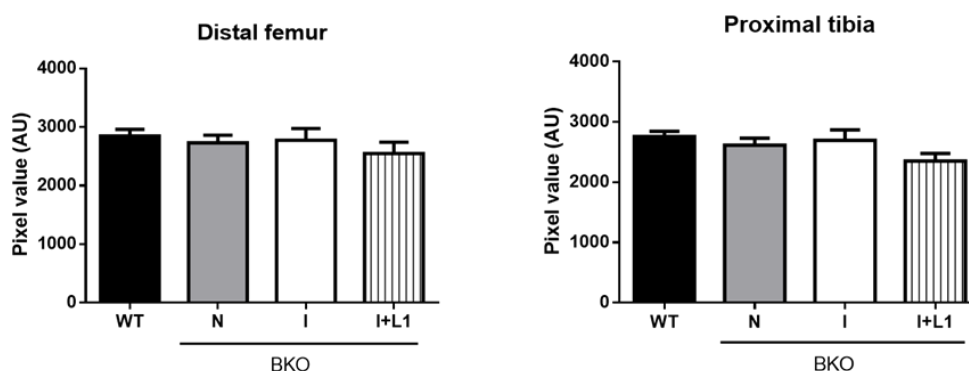


Figure 1. Image analysis of bone densities in distal femur and proximal tibia. WT, wild-type control; N, control; I, iron overload; I+L1, iron overload+deferiprone; BKO, β -knockout. These data show the mean \pm SEM (n=5), *P < 0.05.

Based on gross examination of the tissue slides, in which iron was detected by staining with Perl's Prussian blue (blue stain), as expected, iron was found to accumulate in the bone marrow of **iron overloaded BKO mice (Figure 2). In addition, iron was also found in the compact bone and trabecular bone as well as in the cells found in the surface of bone. However,** this accumulation was not observed in WT and BKO mice. Consistent with the present finding, it was reported that iron accumulated abundantly in bone marrow of the iron-overloaded male mice² and trabecular surface of HFE^{-/-} mice, a mouse model of hemochromatosis¹⁰. In addition, iron was also reported to accumulate along mineralization fronts and osteoid surfaces in thalassemic patients with iron overload¹¹. Interestingly, iron was not found in the articular cartilage of both femur and tibia bone as indicated by lack of blue stained (Figure 2). Moreover, in iron overloaded BKO mice treated with L1, iron appeared to accumulate with lesser amount in the areas indicated above, suggesting that L1 may be effective in removing iron in the bone.

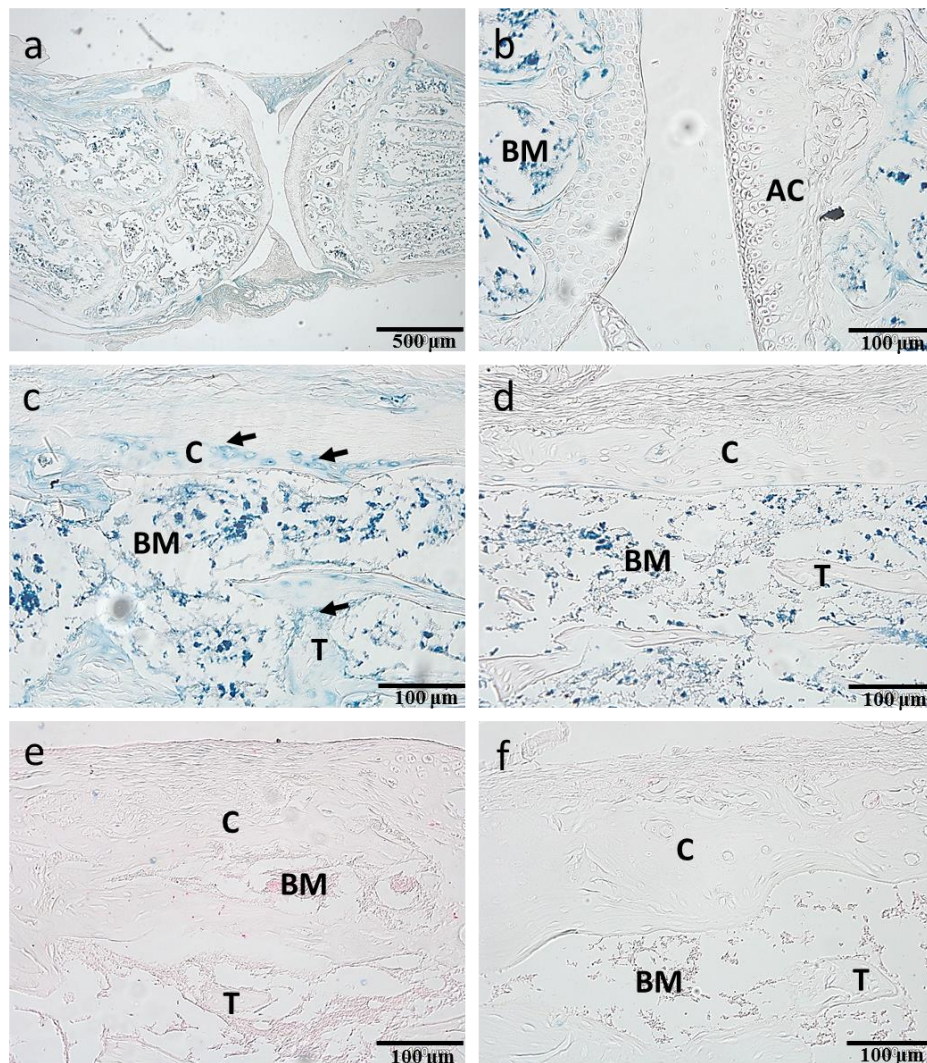


Figure 2. Perl's Prussian blue staining in decalcified bone section at 40× original magnification (A), in iron overloaded (C), DF-treated (D) BKO, normal wild-type (E), control BKO (F) and Articular cartilage was not stained Perl's Prussian blue (B) at 200× original magnification. Arrow indicated iron deposits in cells. AC: articular cartilage, C: compact bone, T: trabeculae, BM: bone marrow.

Conclusion

This study demonstrated that BMD was not affected by the disease and the iron overload condition when assessed by using X-ray method. However, further investigations using micro-CT technique are required to confirm this finding. In addition, accumulation of iron was found in the bone marrow, compact bone, and trabecular bone of iron overloaded BKO mice, as well as in the cells that were found

in the surface of bone. The result in this study suggested that the current available iron chelator, deferiprone (L1) could be as effective in chelating iron as previously seen in well-studied tissues such as heart and liver, which in turn could improve the quality of life of aging patients with thalassemia.

Acknowledgements

This work was supported by the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative; by Thailand Research Funds and the Commission on Higher Education (RMU5480001). Deferiprone was provided by the Government Pharmaceutical Organization. Ms. Scarlett Shanika Desclaux was supported by Development and Promotion of Science and Technology talents Project (DPST).

References

1. Thongchote K, Svasti S, Teerapornpantakit J, Suntornsaratoon P, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Bone microstructural defects and osteopenia in hemizygous betaIVSII-654 knockin thalassemic mice: sex-dependent changes in bone density and osteoclast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(11):E936-48.
2. Tsay J, Yang Z, Ross FP, Cunningham-Rundles S, Lin H, Coleman R, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood.* 2010;116(14):2582-9.
3. Domrongkitchaiporn S, Sirikulchayanonta V, Angchaisuksiri P, Stitchantrakul W, Kanokkantapong C, Rajatanavin R. Abnormalities in bone mineral density and bone histology in thalassemia. *J Bone Miner Res.* 2003;18(9):1682-8.
4. Economides CP, Soteriades ES, Hadjigavriel M, Seimenis I, Karantanis A. Iron deposits in the knee joints of a thalassemic patient. *Acta Radiol Short Rep.* 2012;2(1):2047981613477401.
5. Kontoghiorghe CN, Kontoghiorghes GJ. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:465-81.
6. Moon SN, Han JW, Hwang HS, Kim MJ, Lee SJ, Lee JY, et al. Establishment of secondary iron overloaded mouse model: evaluation of cardiac function and analysis according to iron concentration. *Pediatr Cardiol.* 2011;32(7):947-52.
7. Yatmark P, Morales NP, Chaisri U, Wichaiyo S, Hemstapat W, Srichairatanakool S, et al. Iron distribution and histopathological characterization of the liver and heart of beta-thalassemic mice with parenteral

- iron overload: Effects of deferoxamine and deferiprone. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66(7):333-43.
8. Pisani P, Renna MD, Conversano F, Casciaro E, Muratore M, Quarta E, et al. Screening and early diagnosis of osteoporosis through X-ray and ultrasound based techniques. *World J Radiol.* 2013;5(11):398-410.
 9. D'Elia G, Caracchini G, Cavalli L and Innocenti P (2009) Bone fragility and imaging techniques. *Clin Cases Miner Bone Metab* 6:234-246.
 10. Guggenbuhl P, Fergelot P, Doyard M, Libouban H, Roth MP, Gallois Y, et al. Bone status in a mouse model of genetic hemochromatosis. *Osteoporos Int.* 2011;22(8):2313-9.
 11. Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit A, Karnsombat P, Choubtum L, Sriphrapadang A, et al. Bone histomorphometry in children and adolescents with beta-thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(8):3966-72.

B10**Protective Effects of Cyanidin-3-Rutinoside Against Formation of Insulin Fibrillation****Thanyaporn Saithong¹, Weerachat Sompong², Thavaree Thilavech², Sirichai Adisakwattana²**

¹*Graduate Program in Food and Nutrition, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

²*Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Abstract

Insulin fibrillation is a physical process in which non-native insulin molecules interact with each other to form insulin aggregates, resulting in insulin fibrils. There are many environmental factors affecting insulin fibril formation such as protein concentration, temperature, pH and agitation. These aggregates are formed during production process of insulin injection and also known to form around insulin injection sites in diabetic patients. Current approaches for preventing insulin fibrillation are small molecules from natural products that specifically and efficiently inhibit the aggregation process. Cyanidin-3-rutinoside (C3R), a natural anthocyanin widely exists in fruits and vegetables, has been reported to possess anti-oxidant and anti-hyperglycemia activity. The aim of study was to examine the effect of C3R on of the formation of insulin fibrillation. The various factors of the insulin fibrillation process including insulin concentration (0.5 and 1 mg/mL), temperature (37°C and 60°C), pH (acidic pH and neutral pH), incubation time (24 h), and agitation were investigated. The formation of insulin fibril was measured using thioflavin-T (ThT) fluorescence assay, fluorescence microscopy and transmission electron microscopy (TEM). The results demonstrated that an increase in insulin concentration, elevated temperature, acidic pH, incubation time and agitation resulted in faster growth and higher amount of insulin fibrils ($p < 0.05$). The selected conditions for induction of insulin fibrillation were insulin concentration of 1 mg/mL at 37°C under pH 1.6 and 250 rpm agitation for 24 h. The presence of C3R in solution at the molar ratio of insulin:C3R 1:0.0625 and 1:0.125 significantly reduced amyloid formation of insulin. Moreover, C3R interrupted the performed insulin fibril and altered the morphology of mature insulin fibrils into short and thinner bundled fibrils. These findings suggest

that C3R could protect against insulin amyloid formation. Therefore, C3R may be a promising agent for prevention of the formation of insulin fibrillation.

Keywords: Insulin, amyloid fibril, cyanidin-3-rutinoside, morphology

ฤทธิ์ป้องกันของไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ต่อการต้านการเกิดโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลิน

ธัญพร สายทอง¹, วีรฉัตร สมพงศ์², ถาวรีย์ ธิละเวช², สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา²

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอาหารและโภชนาการ ภาควิชาโภชนาการและการกำหนดอาหาร คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย

²ภาควิชาโภชนาการและการกำหนดอาหาร คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย

บทคัดย่อ

การเกิดโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลินเป็นกระบวนการทางกายภาพที่เกิดจากการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างอินซูลินที่มีการเปลี่ยนสภาพโมเลกุลไปจนเกิดการเกาะกลุ่มของอินซูลิน และส่งผลให้เกิดเส้นใยอมัยลอยด์ ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อการเกิดโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลิน เช่น ความเข้มข้นของโปรตีน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างและการสั่นสะเทือน การก่อดำของเส้นใยอมัยลอยด์สามารถเกิดได้ในระหว่างกระบวนการผลิตยาฉีดอินซูลินและยังพบได้ในพื้นที่บริเวณผิวหนังของผู้เบาหวานที่มีการฉีดอินซูลินเป็นประจำ ปัจจุบันมีวิธีการในการการป้องกันการก่อดำของโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลินโดยใช้โมเลกุลขนาดเล็กที่พบได้ในธรรมชาติซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกระบวนการดังกล่าว สารไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์เป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานินที่พบได้ทั่วไปในพืชผักและผลไม้ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ต่อกระบวนการเกิดเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลิน และศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลินประกอบด้วยความเข้มข้นของอินซูลิน (0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อุณหภูมิ (37 และ 60 องศาเซลเซียส) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH 1.6 และ 7.4) ระยะเวลาในการบ่ม (24 ชั่วโมง) และการสั่นสะเทือน การเกิดโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ตรวจวัดด้วยวิธี thioflavin-T fluorescence วิธี fluorescence microscopy และ วิธี transmission electron microscopy (TEM) ผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นอินซูลิน อุณหภูมิ ภาวะกรด ระยะเวลาในการบ่มและการสั่นสะเทือน ส่งผลในการเพิ่มอัตราเร็วและปริมาณการก่อดำของเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลิน ($p < 0.05$) สภาวะที่เลือกนำมาใช้ในการกระตุ้นการเกิดโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลินคือ อินซูลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะกรด (pH 1.6) และการสั่นสะเทือนที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ที่อัตราส่วนของอินซูลิน:สารไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์คิดเป็น 1:0.0625 และ 1:0.125 สามารถลดการเกิดโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ของอินซูลินอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้สารไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ยังรบกวนการ

ก่อดำของเส้นใยอัยลลยดและเปลี่ยแปลงโครงสร้างเส้นใยอัยลลยดให้มีลักษณะสั้นและเล็กลง ผลการวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารไซยานิดิน-3-รุตินอไซด์สามารถป้องกันการก่อดำของเส้นใยอัยลลยดของอินซูลินได้ ดังนั้นสารไซยานิดิน-3-รุตินอไซด์อาจเป็นสารในป้องกันการเกิดโครงสร้างเส้นใยอัยลลยดของอินซูลินได้ในอนาคต

คำสำคัญ: อินซูลินไซยานิดิน ,เส้นใยอัยลลยด ,**3-รุตินอไซด์**รูปร่างลักษณะของเส้นใย ,

Introduction

Insulin fibrillation is a physical process by which partially unfolded insulin molecules that subsequently interact with each other to form linear aggregates, resulting in mature insulin fibrils¹. Insulin forms amyloid like fibrils under a variety of conditions such as insulin concentration, temperature, pH and agitation². The formation of insulin fibrils is a problem in biotechnological applications because insulin fibrils can be formed during production process of insulin injection³. Moreover, insulin fibrils have been observed in patients with diabetes after repeated subcutaneous insulin injection which cause the impairment of insulin absorption and associating with severe insulin resistance⁴.

Natural bioactive compounds such as curcumin, quercetin and gallic acid showed an effective inhibitory activity on amyloid fibril formation⁵. Anthocyanins, a natural phytochemical, have been demonstrated a number of pharmacological properties including anti- inflammation, anti- carcinogenic, cardioprotective, neuroprotective, anti- diabetic activities and also inhibiting amyloid fibrillation⁶. Cyanidin-3-rutinoside (C3R), a naturally occurring anthocyanin, has been found with high content in vegetables and fruits⁷. Previous studies showed that C3R potentially inhibited the formation of advanced glycation end products (AGEs), the damage of oxidative-dependent protein⁸. C3R also showed anti-hyperglycemic activities by inhibiting α -glucosidase and pancreatic α -amylase *in vitro* and *in vivo*⁸. However, no research has evaluated the potential effectiveness of C3R in relation to its activity against insulin fibril formation *in vitro*. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effects of C3R on formation of insulin fibrils derived from recombinant human insulin.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

Recombinant human insulin (MW 5807.6 g/mol) was purchased from MP Biomedicals, LLC, (Illkirch, France). Hydrochloric acid, sodium hydroxide and thioflavin-T (ThT) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). Other reagents were of analytical grade.

Cyanidin-3-rutinoside (C3R) synthesis

Cyanidin-3-rutinoside was synthesized according to a previous study⁹. Rutin or quercetin-3-O-rutinoside was dissolved in 3% methanol-HCl to give C3R by mixing with zinc amalgam. The C3R was purified by column chromatography. Thereafter, the methanolic solution of C3R was gently evaporated by using a rotary evaporator.

Preparation of insulin fibrils

Insulin fibril was prepared according to the previous study¹⁰. Insulin solution (0.5 and 1 mg/mL) was freshly prepared in 0.025M HCl with 0.1M NaCl (pH 1.6). For

studying the effect of temperature on insulin fibrillation, 0.5 and 1 mg/mL insulin solution were incubated at 37°C and 60°C. The effect of pH on insulin fibrillation was studied by using 0.5 and 1 mg/mL insulin which was dissolved in 0.025M HCl with 0.1M NaCl at pH 1.6 or 20 mM phosphate buffer with 0.1M NaCl at pH 7.4. The effect of agitation on insulin fibrillation was studied by incubating the samples with and without shaking at 250 rpm. For investigating the effect of C3R on insulin fibrillation, 0.5 and 1 mg/mL insulin solution were mixed with C3R to get 1:0, 1:0.0625 and 1:0.125 molar ratio of insulin:C3R complexes. Then, they were incubated at 37°C under stirring condition at 250 rpm for 24 h. Insulin fibrils were collected at every hour.

Determination of insulin fibrillation

Insulin fibrils formation was measured by Thioflavin-T, a fluorescent dye, according to the previous study¹⁰. Briefly, insulin fibril was mixed with 20 µM ThT solution. ThT fluorescence intensity was measured at the excitation wavelength of 435 nm and emission wavelength of 485 nm. The formation of insulin fibril was observed by using a fluorescence microscope (Nikon eclipse Ts2-FL). The characterization of insulin fibrils was detected by using transmission electron microscopy (TEM) according to the previous study with slight modification¹¹. Samples were dropped onto Formvar-carbon coated copper-mesh grids and negatively stained with 1% (w/v) uranyl acetate. Observations were carried out using an electron microscope with an accelerating voltage of 80 kV.

Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate and the values were presented as means ± SD. Data was analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's post hoc test. Difference was considered statistically significant at P-value < 0.05.

Results

Effects of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation

As shown in Figure 1A, a significant increase in ThT fluorescence intensity and faster growth of fibrils were observed after incubating insulin under acidic pH at 60°C without agitation for 24 h, as compared with the control incubated at 37°C ($p < 0.05$). The pH effect showed that the pH 1.6 caused greater and faster formation of insulin fibril than at the pH 7.4 ($p < 0.05$) (Figure 1B). Under the absence of agitation, insulin fibrillation was slightly formed compared to agitation at 250 rpm ($p < 0.05$) (Figure 1C). Moreover, at 1 mg/mL insulin had higher and faster increase in the formation of insulin fibril compared to 0.5 mg/mL insulin in all conditions. It suggests that the condition including insulin concentration of 1 mg/mL at 37°C under pH 1.6 and 250 rpm agitation gave a significant growth curve and fibril formation which was

subjected for further studies (Figure 2A). The results from ThT fluorescence assay were confirmed by using a fluorescence microscope. As demonstrated in Figure 2B, insulin (1 mg/mL) showed no fibrils formed at 0 h. After incubation for 24 h, insulin became aggregate and formed straight needle-like fibrils.

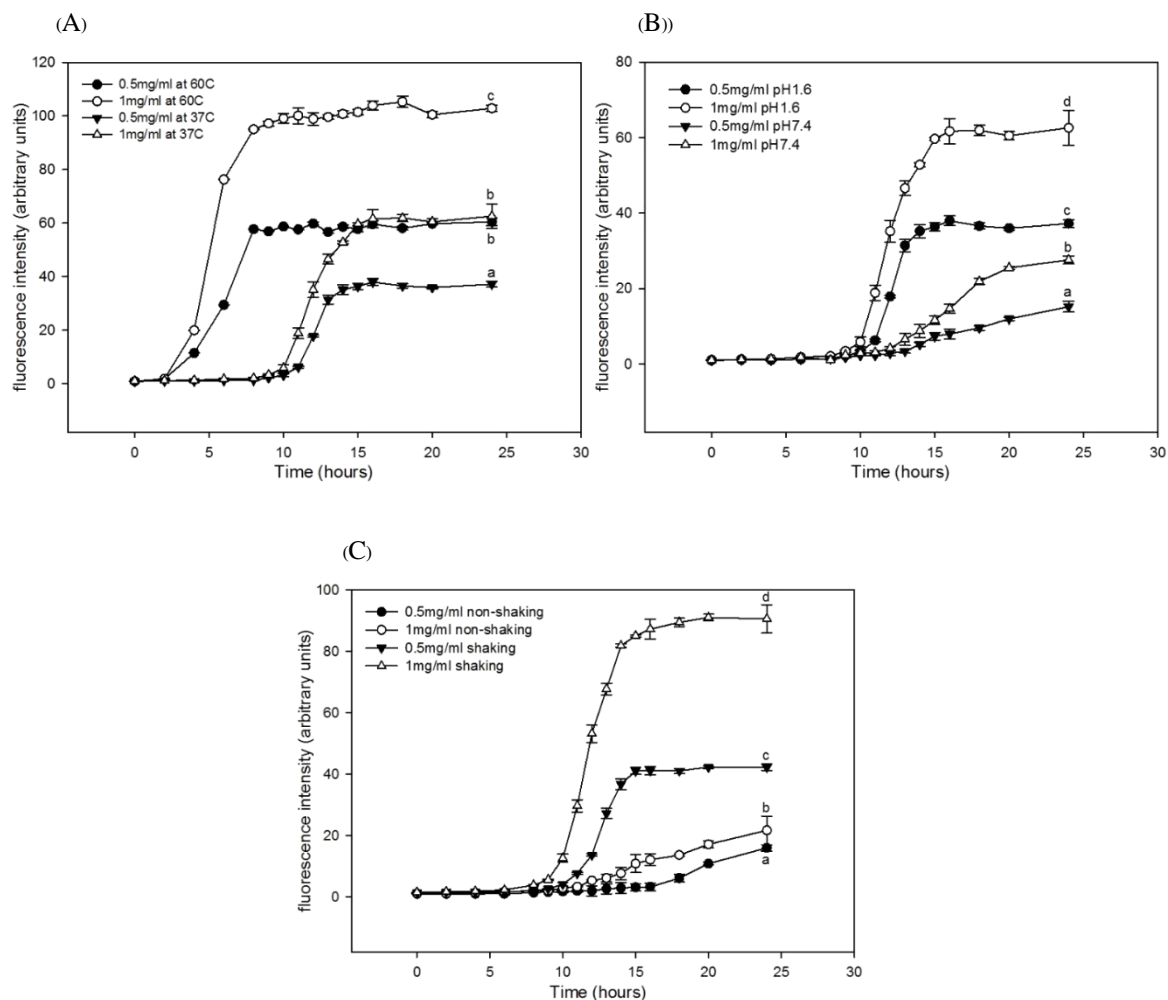


Figure 1. Kinetics of insulin fibril formation in different environmental factors measured by ThT fluorescence assay. (A) The effect of temperature on insulin fibril formation; 0.5 and 1 mg/mL insulin were incubated at 37°C and 60°C under acid pH for 24 h. (B) The effect of pH on insulin fibril formation; 0.5 and 1 mg/mL insulin were incubated at 37°C under pH 1.6 and 7.4 for 24 h. (C) the effect of agitation on insulin fibril formation; 0.5 and 1 mg/mL insulin were incubated at 37°C under acid pH with 250 rpm and non-shaking for 24 h. The results are presented as mean±SEM (n=3). Groups do not shared a common letter are significant difference. P-values of less than 0.05 are considered as statistically significant.

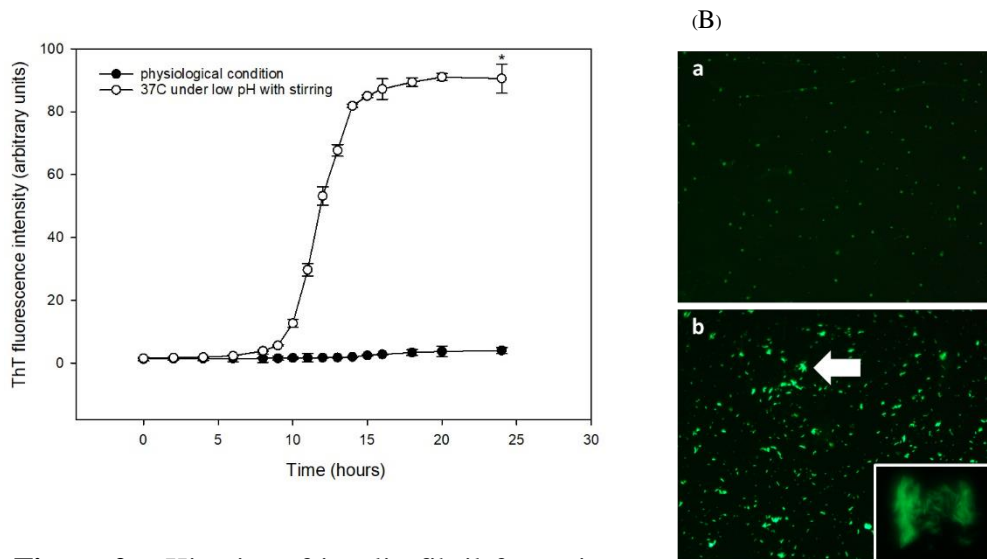


Figure 2. Kinetics of insulin fibril formation at 1mg/ml insulin concentration. (A) The growth curve of insulin fibril formation measured by ThT fluorescence assay. 1mg/ml insulin was incubated at 37°C under physiological pH (filled circle) and 37°C under acidic pH with 250rpm (open circle) for 24 h. (B) Fluorescence microscopy images of insulin fibril formed; 1mg/ml insulin at 0 h (a) and 24 h (b). Scale bar represents 100 μ m. The results were presented as mean \pm SEM (n=3). The differences are statistically significant if P-values < 0.05.

Effects of C3R on insulin amyloid fibril formation

As shown in Figure 3A, when incubating insulin with C3R at various molar ratios, the insulin fibrils formation was markedly delayed, resulting in a significant decrease in the final ThT fluorescence intensity ($p < 0.05$). At the 1:0.0625 and 1:0.125 molar ratio of insulin:C3R, they inhibited the insulin fibrils formation by 19.44% and 29.87%, respectively. Moreover, an increase in molar ratio of insulin:C3R resulted in an increase in the lag time of the insulin fibril growth. The lag time of insulin alone after 24 h was 10.3 \pm 0.2 h. When C3R was added at 1:0.0625 and 1:0.125 molar ratio of insulin:C3R, the lag time was increased to 11.9 \pm 0.2 and 13.2 \pm 0.2 h, respectively ($p < 0.05$). According to the images from TEM (Figure 3B), no fibril in insulin alone at 0 h was observed. After 24 h of incubation, insulin alone became aggregated and contained a high density of needle-like fibrils and dense networks of long fibrils. In the presence of C3R, the insulin assemblies showed different morphologies, depending on the concentration of C3R added. Small aggregates were found when insulin was incubated with 1:0.0625 molar ratio of insulin:C3R. At 1:0.125 molar ratio of insulin:C3R, short and bundled fibrils were observed.

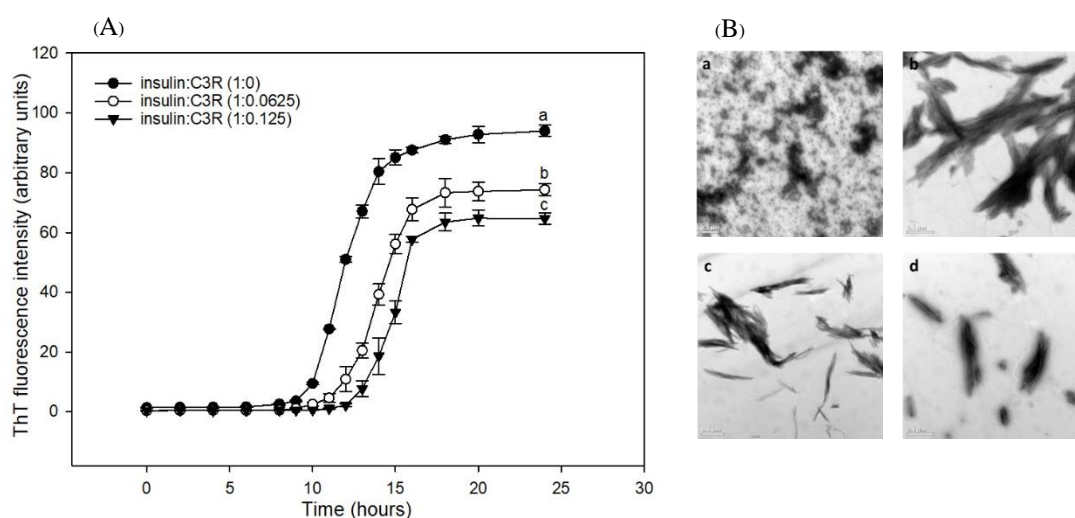


Figure 3. The effects of C3R on insulin fibril formation. (A) The effects of C3R on the formation of insulin fibrils measured by ThT fluorescence assay. Samples were prepared by incubating insulin (1 mg/mL) at 37°C under acidic pH with 250 rpm for 24 h in the absence and presence of C3R in different molar ratio. (B) TEM images of insulin:C3R complexes; (a) insulin alone (1 mg/mL) incubated at 37°C under acidic pH at 0 h; insulin:C3R complexes at 1:0 (b), 1:0.0625 (c) and 1:0.125 (d) molar ratios after 24 h incubation at 37°C under acidic pH with 250 rpm. Scale bar represents 0.5 μm . The results are presented as mean \pm SEM ($n=3$). Groups do not shared a common letter are significant difference ($p<0.05$).

Discussion

Insulin fibrillation is a common physical instability problem in the development of many diseases². It has been shown that several proteins are able to interact with each other, resulting in the formation of insulin fibrils under both physiological and non-physiological conditions^{4,12,13}. Insulin aggregates are observed at the sites of repeated insulin injection in diabetic patients especially in type 1 diabetes⁴. Moreover, it is formed during the production process of insulin injection¹². The changes of native insulins to insulin fibrils can be induced by various factors¹². In the present study, we found that the tendency to insulin fibrillation increased with elevated temperature, acidic pH, agitation and an increasing insulin concentration indicated by ThT fluorescence assay. Previous studies found that exposure of insulin to extreme temperature, low pH, vigorous agitation and higher insulin concentration resulted in shorter lag time and faster growth of fibrils^{12,13}. The formation of insulin fibrils was confirmed by using a fluorescence microscope. It showed a high content of straight needle-like fibrils, bundles and dense networks of long fibrils.

The insulin fibrillation is associated with many diseases and the stability of insulin injection⁴. There is an important need to identify approaches that may prevent insulin fibril formation and this study shows for the first time that C3R effectively inhibited insulin fibrillation. The results reported that C3R at various concentrations significantly decreased ThT fluorescence intensity, delayed the lag time, and altered the morphology of mature insulin fibril, indicating C3R can inhibit the formation of insulin fibrils. These findings consistent with previous studies which showed that many polyphenols such as ferulic acid, quercetin, epigallocatechin gallate (EGCG) and quinone can inhibit insulin amyloid fibril formation^{10,11,16,17}. The effectiveness of C3R in reducing the formation of insulin fibrils can be explained by the effect of C3R on disturbing the insulin fibril formation. Studies suggested that the inhibitory activity of polyphenols can occur via several mechanisms which depends on the chemical structure of compounds^{2,10,16}. It is possible that C3R containing aromatic rings, hydroxyl groups may interact with amino acid of insulin through hydrophobic bonding, resulting in inhibition of insulin fibrillation. Additional computational studies are required for identification of its interaction.

Conclusion

The present study shows that C3R can inhibit insulin fibril formation and change the mature insulin fibrils into short and thinner fibrils. The results suggest that C3R may be application to delay the growth of insulin fibrils and prevent the formation of insulin fibrillation.

Acknowledgements

This work was supported by Grant for International Research Integration: Chula Research Scholar, Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Chulalongkorn University.

References

1. Caso G, McNurlan MA. Effect of insulin on whole body protein metabolism in children with type 1 diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(1):93-6.
2. Kitagawa K, Misumi Y, Ueda M, Hayashi Y, Tasaki M, Obayashi K, et al. Inhibition of insulin amyloid fibril formation by cyclodextrins. *Amyloid*. 2015;22(3):181-6.
3. Kudo Watanuki S, Kurihara E, Yamamoto K, Mukai K, Chen K. Coexistence of insulin-derived amyloidosis and an overlying acanthosis nigricans-like lesion at the site of insulin injection. [Clin Exp Dermatol](#). 2013;38(1):25-9.
4. Yumlu S, Barany R, Eriksson M, Rocken C. Localized insulin-derived amyloidosis in patients with diabetes mellitus: a case report. *Hum Pathol*. 2009;40(11):1655-60.

5. Cheng B, Gong H, Xiao H, Petersen RB, Zheng L, Huang K. Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: a therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(10):4860-71.
6. Vepsäläinen S, Koivisto H, Pekkarinen E, Mäkinen P, Dobson G, McDougall GJ, et al. Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. [*J Nutr Biochem*](#). 2013;24(1):360-70.
7. Feng R, Ni HM, Wang SY, Tourkova IL, Shurin MR, Harada H, et al. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. [*J Biol Chem*](#). 2007;282(18):13468-76.
8. Thilavech T, Ngamukote S, Abeywardena M, Adisakwattana S. Protective effects of cyanidin-3-rutinoside against monosaccharides-induced protein glycation and oxidation. [*Int J Biol Macromol*](#). 2015;75:515-20.
9. Elhabiri M, Figueiredo P, Fougerousse A, Brouillard R. A convenient method for conversion of flavonols into anthocyanins. *Tetrahedron Lett*. 1995;36(26):4611-4.
10. Ono K, Hirohata M, Yamada M. Ferulic acid destabilizes preformed β -amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(2):444-9.
11. Wang J-B, Wang Y-M, Zeng C-M. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;415(4):675-9.
12. Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, et al. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*. 2001;40(20):6036-46.
13. Selivanova O, Galzitskaya O. Structural polymorphism and possible pathways of amyloid fibril formation on the example of insulin protein. *Biochemistry (Mosc)*. 2012;77(11):1237-47.
14. Peters AL, Ahmann AJ, Battelino T, Evert A, Hirsch IB, Murad MH, et al. Diabetes Technology-Continuous Subcutaneous Insulin Infusion Therapy and Continuous Glucose Monitoring in Adults: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):3922-37.
15. Ahmad A, Uversky VN, Hong D, Fink AL. Early events in the fibrillation of monomeric insulin. *J Biol Chem*. 2005;280(52):42669-75.
16. Zhu W, Peng J-m, Ge Z-z, Li C-m. A-type dimeric epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a more potent inhibitor against the formation of insulin amyloid fibril than EGCG monomer. *Biochimie*. 2016;125:204-12.
17. Gong H, He Z, Peng A, Zhang X, Cheng B, Sun Y, et al. Effects of several quinones on insulin aggregation. *Sci Rep*. 2014;4.

B12

Metformin Induced Cytotoxicity in Cervical Cancer Cell Line

Henna Hakimee¹, Pilaiwanwadee Hutamekalin², Supita Tanasawet³ and Wanida Sukketsiri¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand.

²Department of Physiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand.

³Department of Anatomy, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand

Abstract

Metformin is one of the most antidiabetics commonly used in type 2 diabetes. A role of metformin against tumorigenesis has currently been implicated and several studies also reported the lack of anticancer activity of the antidiabetics. To further elaborate these findings, the aim of study was to investigate effect of metformin on cytotoxicity in human cervical cancer (HeLa) cell line. The cytotoxicity was determined using the MTT assay and the alteration of cell morphology was assessed with an inverted microscope. The results show that metformin dose- and time-dependently inhibited the growth of HeLa cells and the IC₅₀ values were 35.00±2.51 and 30.00±5.64 mM at 12 and 24 h, respectively. In addition, metformin caused a decrease number of viable cells, and rounded in shaped followed by detached from the tissue culture plate. We suggest that metformin possesses anti-proliferative activity via an induction of cell cytotoxic and decreased the growth in HeLa cervical cancer cell lines.

Keywords: Antidiabetics, HeLa cell line, cervical cancer

เมทฟอร์มินชักนำให้เกิดความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

เสนาฮา ฮากิม¹, พิไลวรรณวดี หุตะเมขลิน², ศุภิตา ธนะเสวตรวินิตา สุขเกษศิริ,^{33,*}

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

²ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

³ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

บทคัดย่อ

เมทฟอร์มินเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากที่รายงานถึงบทบาทของเมทฟอร์มินในการต้านการเกิดมะเร็ง แต่ในหลายการศึกษาที่ผ่านมา ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของยาในระดับน้ำตาลในเลือด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเมทฟอร์มินต่อความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีทีและดูการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ผลการทดลองพบว่าเมทฟอร์มินยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยขึ้นกับขนาดและระยะเวลาที่ได้รับสาร โดยมีความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ร้อยละ เท่ากับ $50 \pm 35.00 \pm 2.51$ และ 30.00 ± 5.64 มิลลิโมลาร์ เมื่อได้รับเมทฟอร์มินเป็นเวลา 12 และ ชั่วโมง ตามลำดับ 24 นอกจากนี้เมทฟอร์มินมีผลเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยทำให้เซลล์หดตัว หลุดออกจากภาชนะเลี้ยงและมีจำนวนเซลล์ลดลง จากผลการทดลองครั้งนี้บ่งชี้ว่าเมทฟอร์มินมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์โดยทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกเกิดความเป็นพิษและลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

คำสำคัญ: ยาลดน้ำตาลในเลือด, เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก, มะเร็งปากมดลูก,

Introduction

Cervical cancer was found a high incidence of cancer in women with the new cases approximately in 470,000 people. The number of deaths from cervical cancer was about 233,000 people per year and 85 percent of cervical cancer cases were found in the developing countries.¹ In particularly, patients with preexisting type 2 diabetes (T2DM) present a higher risk of cancer progression and cancer-related mortality.

Metformin is a biguanide, most widely prescribed drug for T2DM. Furthermore, the abundant of epidemiologic studies repeatedly marked that T2DM patients taking metformin, compared to those receiving other antidiabetic medications, had a reduced risk of the occurrence of various types of cancers.² In addition, this observation was also proved by numerous meta-analyses confirming that metformin decreases cancer incidence by 30-50% by efficiently inhibiting the growth of various tumors via the inhibition of mechanistic target of rapamycin (mTOR) dependent and independent on AMP-activated protein kinase (AMPK) activation.^{2,3} In addition, the study reported that metformin suppressed the proliferation of cervical cancer cells by regulating apoptosis and autophagy.³ The aim of this study was to investigate cytotoxic and growth inhibitory effects of metformin on cervical cancer cells.

Materials and Methods

Cell line and culture conditions

Human cervical cancer (HeLa) cell line were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and were cultured in [Eagle's Minimum Essential Medium \(EMEM\)](#) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic and 2 mM L-glutamine. HeLa cells were maintained in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂.

Drug and reagents

Metformin and MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] were provided from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The stock solution was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the final concentration of DMSO in culture medium was always less than 0.1% (v/v), which was non-toxic to the cell cultures.

Cytotoxicity assays

The cell viability was assessed using the MTT assay. HeLa cells were grown in a 96-well plate at a density of 1×10^4 cells/well and incubated for 6, 12, and 24 h with metformin at the concentrations of 0, 7.5, 10, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 mM. After the incubation, 0.5 mg/mL of MTT solution was added and incubated for 2 h at 37 °C. Then, the insoluble formazan was dissolved in DMSO and the optical density was determined at 570 nm using a microplate reader (Bio-tex, Highland Park, USA).

Morphological studies of cell lines

The morphology of HeLa cells were examined with an inverted microscope (Olympus IX70, Japan) after cells were exposed to metformin at 0, 10, 25 and 50 mM for 6 and 24 h.

Statistical analysis

All data were presented as a mean \pm SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for testing the differences of the mean values among groups and

pairwise comparisons between groups were analyzed by Tukey post hoc test. Values of $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Result

The cytotoxicity of the metformin in cervical cancer cell line

To examine the cytotoxicity of the metformin, HeLa cells were exposed with the metformin at the concentrations of 0, 7.5, 10, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 mM for 6, 12 and 24 h. The result showed that a treatment with high concentration of the metformin significantly decreased cell viability compared to an untreated group (Figure 1). A significant toxic dose of the metformin was 25 to 50 mM, and the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) in HeLa cells were 35.00 ± 2.51 and 30.00 ± 5.64 mM at 12 and 24 h, respectively.

Effect of metformin on cells morphology of cervical cancer cells

We further examined the cellular morphological changes of HeLa cells after 10, 25 and 50 mM metformin treatment for 6 and 24 h. Cell shrinkage was observed as an early marker of apoptosis at 6 and 24 h. In addition, other types of morphological changes such as the cells rounded up, lose contact with their neighbors, detached from the culture plate and the reduction of cell number were clearly observed at 24 h exposure period when compare to the control (Figure 2).

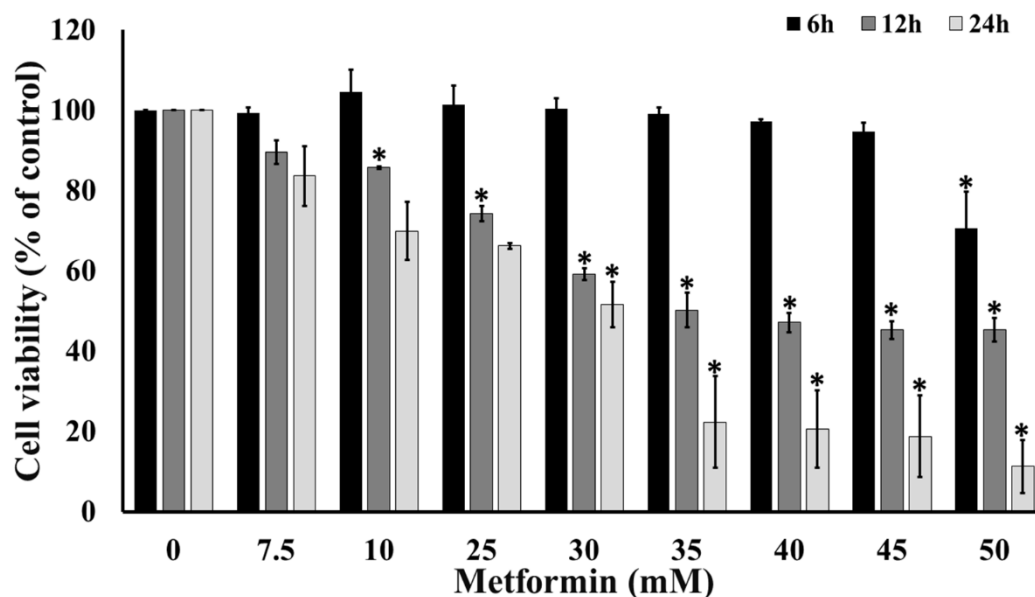


Figure 1. Effect of metformin on HeLa cell viability assessed by MTT assay after 6, 12, and 24 h treatment. Data are shown as mean \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$ versus the untreated control.

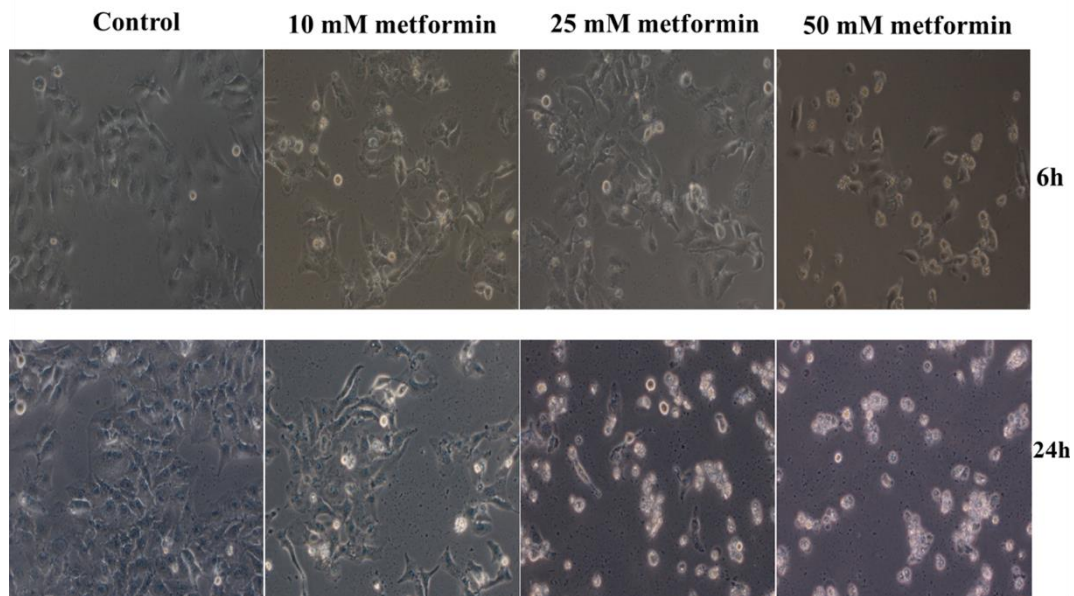


Figure 2. Representative photomicrograph showed the changes of cell morphology of HeLa cells after exposure to metformin for 6 and 24 h. Inverted microscope examined cell morphology on HeLa after treatment with 10, 25 and 50 mM of metformin.

Discussion

This study was performed primarily to investigate cytotoxicity of metformin on human cervical cancer HeLa cells. First of all, effects of metformin on cell viability of HeLa cells were assessed using MTT assay. The results showed that metformin causes significant cytotoxic effect to cervical cancer cells at the range of metformin concentrations between 25-50 mM after 12 and 24 h. Our data demonstrated that metformin exhibited cytotoxicity against HeLa cells in dose- and time-dependent manner, with IC_{50} values expressed from 35.00 ± 2.51 at 12 h, and 30.00 ± 5.64 mM at 24 h, respectively. The result from this study was consistent with the previous study⁴ found that the growth of cervical cancer cell lines such as Caski and SiHa was inhibited by the metformin in a time- and dose-dependent manner. Moreover, breast cancer cell, lung cancer cell, prostate cancer cell, and colon cancer cell proliferations have been inhibited by metformin.^{5,6,7} During apoptosis process, the distinct morphological features of apoptotic cells exhibit nuclear fragmentation and chromatin condensation which initially originate at the peripherally along the nuclear membrane thereafter the apoptotic nucleus would further condenses in the late stage and eventually breaks up.⁸ According to the microscopic examination, metformin treatment could decrease the number of viable cells, and rounded in shaped followed by detached from the culture plate. Phase contrast microscopic study revealed morphological changes with the characteristic of apoptosis and related to the toxicity of metformin. The apoptotic cells demonstrated by the loss of cellular adhesion and early detachment from their basal membrane which are the apoptotic characteristics of monolayer adherent cells.⁹ In addition, classical morphologies of apoptosis, including cell rounding due to shrinkage were observed as early markers of apoptosis.¹⁰ Consistent with this finding, the exposure of metformin induced apoptotic and autophagy in cervical cancer cells.¹¹

In conclusion, our present investigation indicated that metformin inhibited growth of human cervical cancer HeLa cells. However, the cellular mechanisms underlying the inhibition of cell growth need to be further explored.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from Graduate school, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

Reference

1. World Health Organization. Human papillomavirus and related cancers in world. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre) [Internet]. 2010 [cited 2016 February 12]. Available from: www.who.int/hpvcentre
2. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signaling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer*. 2008; 8(12): 915-928.
3. Kasznicki J, Sliwinska A, Drzewoski J. Metformin in cancer prevention and therapy. *Annals of Translational Medicine*. 2014; 2(6): 57.
4. Yung MMH, Chan, DW, Liu VWS, Yao KM, Ngan HYS. Activation of AMPK inhibits cervical cancer cell growth through AKT/FOXO3a/FOXM1 signaling cascade. *BMC Cancer*. 2013; 13(1): 327.
5. Tsutsumi Y, Nomiyama T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Terawaki Y, Tanaka, T, Murase K, Motonaga R, Tanabe M, Yanase T. Combined treatment with exendin-4 and metformin attenuates prostate cancer growth. *PLoS ONE*. 2015; 10(10): e0139709.
6. Bekusova VV, Patsanovskii VM, Nozdrachev AD, Trashkov AP, Artemenko MR, Anisimov VN. Metformin prevents hormonal and metabolic disturbances and 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in non-diabetic rats. *Cancer Biology & Medicine*. 2017; 14(1): 100-107.
7. Athreya AP, Kalari KR, Cairns J, Gaglio AJ, Wills QF, Niu N, Weinshilboum R, Iyer RK, Wang L. Model-based unsupervised learning informs metformin-induced cell-migration inhibition through an AMPK-independent mechanism in breast cancer. *Oncotarget*. 2017; 10: 27199-27215.
8. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *Physiology*. 2004; 19(3): 124-128.
9. Thuret G, Chiquet C, Herrag S, Dumollard J, Boudard D, Bednarz J, Campos L, Gain P. Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *British Journal Ophthalmology*. 2003; 87(3): 346–352.

10. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007; 35 (4): 495–516.
11. Xiao X, He Q, Lu C, Werle KD, Zhao RX, Chen J, Davis BC, Cui R, Liang J, Xu ZX. Metformin impairs the growth of liver kinase B1-intact cervical cancer cells. *Gynecologic Oncology*. 2012; 127(1): 249-255.

B13**High Oxidative Stress and PDGF-BB Levels in Thalassemia Patients Negatively Affect Cultured Endothelial Cells: A Preliminary Study****Krit Rattanawonsakul¹, Sirada Srihirun², Pornpun Vivithanaporn¹, Nathawut Sibmooh¹, Piyanee Ratanachamnong¹, Kittiphong Paiboonsukwong³, Kran Suknuntha¹**¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand²Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok, Thailand³Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand**Abstract**

β -thalassemia/hemoglobin E (Hb E) is one of the most common inherited hematologic disorders in Southeast Asia characterized by an absence of β -globin chain. Vascular complications in β -thalassemia/Hb E patients were believed to involve several mediators including reactive oxygen species (ROS) and growth factors based on both *in vitro* and *in vivo* studies. The aim of this study is to determine the relationship between platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), oxidative stress and their effects on vascular endothelial cells. This pilot study recruited four healthy volunteers and four β -thalassemia/Hb E. Our results demonstrated that extracellular oxidative stress biomarkers in serum (i.e. methemoglobin, lipid peroxidation products) were elevated in thalassemia group. Nitric oxide (NO) consumption in thalassemia plasma was significantly higher when compared with healthy subjects. Additionally, intracellular oxidative signals measured by dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay were significantly increased in thalassemia sera-treated endothelial cells. Although we found high PDGF-BB level in thalassemia serum, unexpectedly the sera inhibited endothelial cell proliferation *in vitro*. We reason that high levels of ROS and bilirubin might play a role in this phenomenon. The exact mechanisms of such inhibition are currently under investigation. In all, our data provides clues that oxidative stress may involve in PDGF-BB-induced vascular complications in thalassemia patients.

Keywords: PDGF, oxidative stress, thalassemia, endothelial, proliferation, complications

Address correspondence and reprint request to: Kran Suknuntha, Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

E-mail address: kran.suk@mahidol.edu

ระดับภาวะเครียดออกซิเดชันและพีดีจีเอฟ-บีบีที่สูงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียส่งผลเสียต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเยื่อบุผิวหลอดเลือด: การศึกษาเบื้องต้น

กฤษฎี รัตนวรรณสกุล¹, สิริดา ศรีศิริ², พรพรรณ วิวิธนาภรณ์¹, ณัฐรุช ลิขหภูมิ¹,
ปิยานี รัตนชานอง¹, กิตติพงศ์ ไพบูลย์สุขวงศ์³, กรานต์ สุขนันทระ¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

³ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

เบต้าธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอีเป็นโรคทางพันธุกรรมของเม็ดเลือดแดงชนิดหนึ่งซึ่งพบได้บ่อยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นผลมาจากความผิดปกติในการสร้างสายโกลบินชนิดเบต้า หลักฐานระบุว่าภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอีอาจเกี่ยวข้องกับรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์และสารกระตุ้นการเจริญเติบโต งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดออกซิเดชันและพีดีจีเอฟ-บีบี รวมถึงผลของปัจจัยทั้งสองต่อเซลล์เยื่อบุผิวหลอดเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ในการศึกษาเบื้องต้นนี้ใช้คนสุขภาพดีและผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอีจำนวน 4 คนต่อกลุ่ม ผลการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันภายนอกเซลล์ (ระดับของเมทฮีโมโกลบินและ ผลิตภัณฑ์ของกระบวนการไลพิดเปอร์ออกซิเดชัน) พบว่ามีค่าสูงขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย นอกจากนี้การทำลายไนตริกออกไซด์ในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีค่าสูงกว่าคนสุขภาพดี ผลการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์บุผิวหลอดเลือดโดยใช้วิธีไดคลอโรไดไฮโดรฟลูออเรสซิน ไดอะซีเตต (DCFH-DA) พบว่ามีค่าสูงขึ้นในกลุ่มที่ใช้ซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียเช่นกัน การศึกษาระดับพีดีจีเอฟ-บีบีโดยวิธีอีไลซ่าให้ผลว่าซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ถึงแม้ว่า พีดีจีเอฟ-บีบี จะเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์แตเมื่อนำซีรัมของผู้ป่วยมาศึกษาในหลอดทดลองกลับพบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุผิวหลอดเลือดซึ่งผลนี้อาจเกิดจากระดับของรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์และปิลูบินในซีรัมของผู้ป่วยที่อยู่ในระดับสูง ซึ่งกลไกการยับยั้งที่แน่ชัดนั้นยังอยู่ในระหว่างการศึกษาเพิ่มเติม จากข้อมูลเบื้องต้นนี้บ่งชี้ว่า ภาวะเครียดออกซิเดชันอาจกระตุ้นการสร้างพีดีจีเอฟ-บีบีและส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

คำสำคัญ: พีดีจีเอฟ-บีบี, ภาวะเครียดออกซิเดชัน, ธาลัสซีเมีย, เซลล์เยื่อบุผิวหลอดเลือด, การเพิ่มจำนวน, ภาวะแทรกซ้อน

Introduction

β -thalassemia is a group of hereditary disorders caused by a mutation on chromosome 11 resulting in the defective of β -globin synthesis. The most common type of β -thalassemia in Thai populations is β -thalassemia/hemoglobin E (Hb E)¹. Excessive unmatched α -globin chains aggravate hemolysis that releases free iron and generates reactive oxygen species (ROS) in the blood.

Platelet-derived growth factor (PDGF) ligands are dimeric peptides which participate in angiogenesis process. Platelets were proposed as the only source of PDGF synthesis; however, recent evidence showed that endothelial cells (EC), smooth muscle cells (SMC), glial cells, and activated macrophage could also produce PDGF².

In particular, PDGF-BB isoform is mostly found in vascular endothelial cells³. Interaction between PDGF-BB-PDGFR- β regulates endothelial cell proliferation during new blood vessels formation⁴. Besides their roles in physiological processes, PDGF-B ligands and PDGFR- β expression were found significantly increased in inflammatory vessels^{5,7}. Administration of imatinib, a PDGF receptor antagonist, effectively improved pulmonary hypertension and reversed vascular remodeling in an animal model⁸ and clinical studies⁹ suggesting that overproduction of PDGF-BB play a role in pathological angiogenic processes.

Endothelial dysfunction generally defines a stage of endothelial cells that impairs normal vascular mechanical properties. The endothelial dysfunction and vascular remodeling are keys pathological events leading to a development of vascular complications including atherosclerosis, pulmonary hypertension, and thromboembolism in thalassemia patients¹⁰⁻¹³. Endothelial cells are key targets of several growth factors and reactive oxygen species (ROS) that involve in the pathogenesis of vascular disorders; however, the association among PDGF-BB, ROS, and vascular complications has not been yet studied. In this pilot study, we aimed to investigate an interplay between ROS, PDGF-BB, and their effects on human pulmonary artery endothelial cells.

Materials and Methods

Subjects and blood collection

Four healthy and four β -thalassemia/Hb E patients were enrolled in this study during November 2016. The protocol was approved by institutional review board (Ramathibodi hospital, Mahidol University, Thailand) on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects under project No.ID-03-56-27. Venous clotted and heparinized blood samples were collected and centrifuged at 1,000 g for 10 minutes at room temperature to obtain serum and plasma respectively. Hemoglobin typing was performed to confirm β -thalassemia/Hb E diagnosis. Participants with history of smoking and alcohol consumption were excluded from this study.

Human Pulmonary Artery Endothelial Cell (HPAEC) culture

Human Pulmonary Artery Endothelial Cell (HPAEC) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC[®], PCS-100-022TM). Cells were grown in 75 cm³ tissue culture flask using complete medium under humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. When the confluency reached 80%, cells were subcultured. All experiments used cells between 4-8 passage. The complete medium was prepared from vascular cell basal medium (ATCC[®], PCS-100-030TM) supplemented with 2%

bovine brain extract (BBE), 2% fetal bovine serum (FBS), 5 ng/ml recombinant human endothelial growth factor, 10 mM L- glutamine, 0.75 units/ml heparin sulfate, 1 µg/mL hydrocortisone hemisuccinate, and 50 µg/mL ascorbic acid (ATCC[®], PCS-100-040TM) and 1% penicillin/streptomycin (Merck, United states).

Measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum

Various concentrations of standard TBARS (i.e. 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 µM) was prepared from 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane standard (TEP) in order to evaluate the concentration of lipid peroxidation products in healthy and thalassemia plasma samples. In this experiment, these following reagents including butylated hydroxytoluene (BHT), trichloroacetic acid (TCA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and thiobarbituric acid (TBA) were mixed with either sera samples or standard in order to produce lipid peroxidation products, malondialdehyde (MDA). Reaction takes place at 100 °C for 1 hour. Then, adding butanol at 1:1 v/v following by centrifugation at 2,000 round/minutes (rpm) for 10 minutes in order to extract MDA. TBARS were measured at 532 nanometers (excitation wavelength) and 553 nanometers (emission wavelength) using a Perkin Elmer LS55 luminescence spectrometer. Concentration of lipid peroxidation products in healthy and thalassemia plasma were calculated from standard curve of TEP.

Determination of potential nitric oxide (NO) consumption

NO donor, DETANONOate, was dissolved in 5 mL of phosphate saline buffer (PBS) to make a 50 µM working concentration before adding into a helium-filled purged glass chamber to supply a nitric oxide to a chemiluminescence nitric oxide analyzer. A 100 µl of plasma sample was injected into the chamber during steady-state of NO signal. A reduction in NO signals was immediately recorded. Area under the curve (AUC) was determined using Origin 7 (OriginLab Corporation, MA). Nitrite concentrations was estimated from standard curve.

Assessment of intracellular oxidative status

Intracellular ROS products were monitored by dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. In this study, HPAECs at the density of 8,000 cells/well were cultured in black 96-well plates with clear bottom. After 24 hours, cells were incubated with 20 µM of DCFH-DA for 40 minutes. Excessive DCFH-DA was washed out prior to samples loading. ROS signals at 30 minutes, 1 hour and 3 hours were detected by a microplate reader (Wallac Victor² V1420) at 490 nm (excitation) and 535 nm (emission).

Measurement of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) levels in serum

Platelet-derived growth factor-BB concentrations were detected by ELISA (Sigma) according to the manufacturer's instructions. The detection limit of this assay was 1 pg/ml. In brief, healthy and thalassemia serum samples were diluted 1:20 with phosphate buffer saline for the assay. One hundred µl of sample was added to each well of 96-well plate and incubated at room temperature for 1 hour. Primary and secondary antibodies were incubated for 60 and 40 min, respectively. The reaction was stopped and absorbance was read at 450 nanometers using a microplate reader (Wallac Victor² V1420). Concentrations of PDGF-BB were extrapolated from the standard curve.

Assessment of HPAECs proliferation

HPAECs were labeled with 1 μ M of carboxy-fluorescein diacetate N-succinimidyl diester (CFSE) at 37°C for 10 minutes for detecting. Then, cells were washed and plated at a density of 80,000 cells per well in 12-well plates using 5% complete media overnight. On the following day, medium was changed to 25% complete media supplemented with 20% serum from indicated subjected for 72 hours. Proliferation of HPAECs was analysed by flow cytometry FACSCanto (BD Bioscience, USA). The effect of PDGF-BB and human sera on HPAEC was analyzed using cell division index calculated by FlowJo software (Tree Star, USA).

Statistical analysis

Data throughout the study were demonstrated as median with interquartile range. Statistical analyses were performed using two-tailed Mann-Whitney test (GraphPad, San Diego, CA). Statistical significance was considered if p -value < 0.05.

Results***Demographic data of healthy volunteers and β -thalassemia/Hb E patients***

β -thalassemia/Hb E patients had higher levels of indirect bilirubin, serum ferritin levels than healthy subjects. Hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV) and aspartate aminotransferase enzyme (AST) are lower in thalassemia group compared with control subjects ($*p < 0.05$). There was no difference in age, serum iron, alanine amino transferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and albumin between these two groups (Table 1).

Extracellular oxidative stress markers

Methemoglobin (MetHb) percentage and TBARs in plasma were measured as markers of extracellular oxidative status. β -thalassemia/ Hb E patients had increased percentage of methemoglobin (2.95 % vs 0.35 %) and TBARs levels (0.32 nmol/mL vs 0.14 nmol/mL) compared with healthy subjects ($*p < 0.05$) (Figure 1A and 1B).

Table 1. Demographic data of healthy volunteers and β -thalassemia/Hb E patients

	Healthy (N = 4)	Thalassemia (N = 4)	Reference Range
Age	32.00 (28.75 - 34.50)	34.50 (24.50 - 61.75)	-
Gender (male/female)	2/2	1/3	-
Hb (g/dL)	14.61 (13.58 - 15.78)	7.95 (7.00 - 8.98)*	13.00 - 18.00
MCV (fl)	85.25 (85.03 - 86.83)	75.40 (67.48 - 81.23)*	80.00 - 99.00
Indirect bilirubin (mg/dl)	0.70 (0.40 - 0.93)	2.30 (1.60 - 5.03)*	0.20 - 1.20
Serum iron (μ g/dL)	96.50 (64.25 - 141.50)	182.50 (126.00 - 230.80)	35.00 - 150.00
Serum Ferritin (ng/ml)	80.05 (54.30 - 320.30)	723.10 (613.00 - 1927.00)*	27.00 - 300.00
AST (U/L)	65.50 (53.50 - 81.25)	24.50 (19.00 - 30.00)*	5.00 - 34.00
ALT (U/L)	19.50 (14.75 - 32.50)	19.00 (15.75 - 24.50)	0.00 - 55.00
ALP (U/L)	18.00 (12.75 - 56.25)	63.00 (56.25 - 92.25)	40.00 - 150.00
Albumin (g/L)	43.75 (38.43 - 45.70)	38.90 (35.23 - 42.28)	35.00 - 50.00

Hb = hemoglobin, MCV = mean corpuscular volume, AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase, ALP = alkaline phosphatase; * $p < 0.05$ by Mann-Whitney test. Numbers in parenthesis are interquartile range.

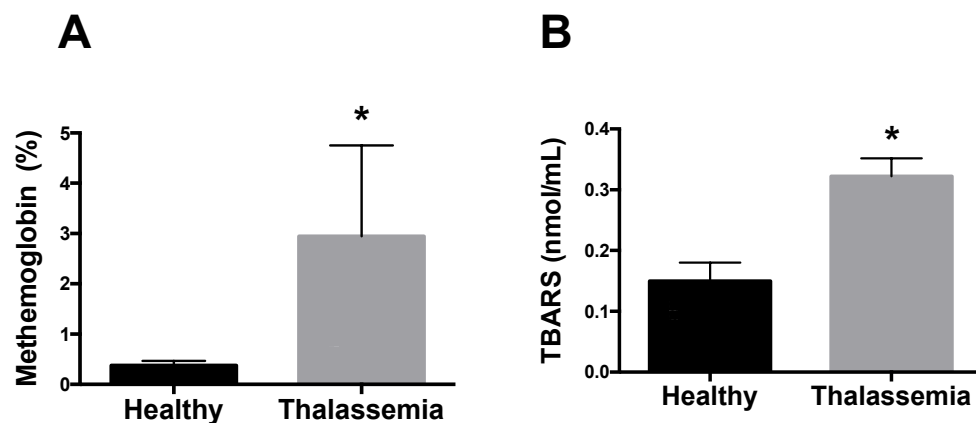


Figure 1. Extracellular oxidative stress markers (A) Methemoglobin percentage and (B) TBARS level in plasma obtained from healthy and β -thalassemia/Hb E subjects (N = 4 each). Data are median with interquartile range. * $p < 0.05$.

NO consumption

The levels of potential NO consumption in β -thalassemia/Hb E plasma were higher than healthy subjects (7.06 μ M vs 0.73 μ M) (* $p < 0.05$) (Figure 2).

Intracellular oxidative status

β -thalassemia/Hb E patient sera induced higher ROS levels in HPAECs compared with healthy sera ($p < 0.05$) (Figure 3).

Increased in PDGF-BB concentrations

β -thalassemia/Hb E patient sera had higher platelet-derived growth factor-BB concentrations than healthy volunteers. (228.10 pg/ml vs 11.92 pg/ml) ($*p < 0.05$) (Figure 4).

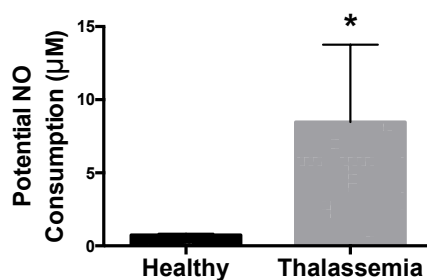


Figure 2. Potential NO consumption in plasma of healthy and β -thalassemia/Hb E subjects
Data are median with interquartile range. (N = 4 each). $*p < 0.05$.

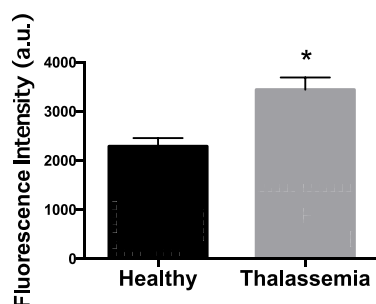


Figure 3. Intracellular ROS levels in serum-treated HPAECs
Data are median with interquartile range. (N = 4 each). $*p < 0.05$

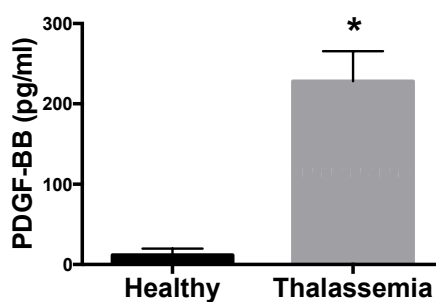


Figure 4. Platelet-derived growth factor-BB levels in serum
Data are median with interquartile range. (N = 4 each). $*p < 0.05$

Thalassemia sera inhibited endothelial cell proliferation

β -thalassemia/Hb E patient sera inhibited human pulmonary artery endothelial cell proliferation compared with healthy groups (0.33 vs 0.72) ($*p < 0.05$) (Figure 5).

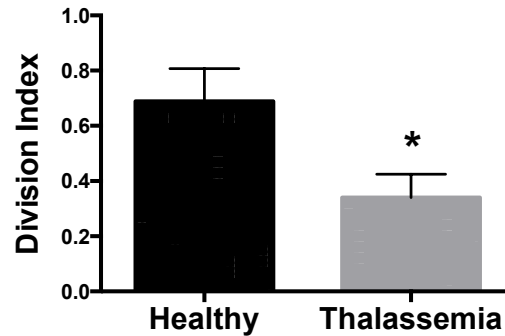


Figure 5. Division index of serum-treated HPAECs

Data are median with interquartile range. (N = 4 each). $*p < 0.05$.

Discussion

Although this preliminary study was carried out on a small group of subjects, our results demonstrated the serum PDGF-BB level in β -thalassemia/Hb E patients is statistically higher than healthy subjects consistent with previous report⁷. Despite PDGF-BB is a growth factor, we unexpectedly found that addition of serum to the 25% complete medium markedly inhibited HPAEC proliferation. This finding indicates that other factors in the serum contribute to the effect. The neuroprotective effect of PDGF-BB suppressing oxidative stress-induced neurotoxicity has been demonstrated in the cultured mouse cortical neurons¹⁴. Therefore, we examined the oxidative status in our study. We found thalassemia patients have significantly high oxidative stress levels in both extracellular and intracellular compartments. Besides, we found our thalassemia patients had high bilirubin and ferritin levels that could inhibit endothelial cell growth in vitro^{15, 16}.

Extended study in a large population is needed to provide enough statistical power and confirm our findings. From our results, it is possible that high ROS levels inhibits endothelial cells and triggers PDGF-BB production as a defensive mechanism, however, the association between high ROS and high PDGF-BB remains unclear. The investigation of precise cellular events of an interplay between ROS and PDGF-BB in a large population is currently underway.

Conclusion

In summary, these findings provide data that an increase of oxidative stress markers together with PDGF-BB levels in thalassemia patients involve in the inhibition of endothelial cell proliferation. However, the definite underlying mechanism of this phenomenon requires further experiments to address an interplay between these two factors and their association with vascular complication in thalassemia.

Acknowledgements

We thank Miss Thanaporn Sriwantana and Miss Jirada Kaewchuchuen for laboratory support. This project was supported by funds from department of Pharmacology and the Central Instrument Facility (CIF), Faculty of Science, Mahidol University (58/023, grant to KS).

References

1. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairuam V. Beta-thalassemia associated with alpha-thalassemia in Thailand. *Hemoglobin*. 1988;12(5-6):581-92.
2. Hughes AD, Clunn GF, Refson J, Demoliou-Mason C. Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen Pharmacol*. 1996;27(7):1079-89.
3. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22(10):1276-312.
4. Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol*. 1994;125(4):917-28.
5. Rubin K, Terracio L, Ronnstrand L, Heldin CH, Klareskog L. Expression of platelet-derived growth factor receptors is induced on connective tissue cells during chronic synovial inflammation. *Scand J Immunol*. 1988;27(3):285-94.
6. Giese NA, Marijjanowski MM, McCook O, Hancock A, Ramakrishnan V, Fretto LJ, et al. The role of alpha and beta platelet-derived growth factor receptor in the vascular response to injury in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):900-9.
7. Perros F, Montani D, Dorfmuller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, et al. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(1):81-8.
8. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2811-21.
9. Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2005;353(13):1412-3.
10. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. 1998;101(4):731-6.
11. Cheung YF, Chan GC, Ha SY. Arterial stiffness and endothelial function in patients with beta-thalassemia major. *Circulation*. 2002;106(20):2561-6.
12. Morris CR, Gladwin MT, Kato GJ. Nitric oxide and arginine dysregulation: a novel pathway to pulmonary hypertension in hemolytic disorders. *Curr Mol Med*. 2008;8(7):620-32.

13. Taher A, Isma'eel H, Mehio G, Bignamini D, Kattamis A, Rachmilewitz EA, et al. Prevalence of thromboembolic events among 8,860 patients with thalassaemia major and intermedia in the Mediterranean area and Iran. *Thromb Haemost.* 2006;96(4):488-91.
14. Zheng L, Ishii Y, Tokunaga A, Hamashima T, Shen J, Zhao QL, et al. Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved. *J Neurosci Res.* 2010;88(6):1273-84.
15. Coffman LG, Parsonage D, D'Agostino R, Jr., Torti FM, Torti SV. Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(2):570-5.
16. Bunyaratvej A, Funahara Y, Butthep P, Kitaguchi H, Fucharoen S. Thalassaemic serum impairs endothelial cell growth in vitro. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1992;23 Suppl 2:105-9.

B14**Absolute Oral Bioavailability and Disposition Kinetics of Puerarin in Female Rats****Pilaslak Poo¹, Natthaphon Hunsakunachai¹, Ratchanee Rodsiri¹, Suchinda Malaivijitnond², Phisit Khemawoot^{1,3}**¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand²Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand³Chulalongkorn University Drug and Health Products Innovation Promotion Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand**Abstract**

Pueraria candollei var. *mirifica* is a medicinal plant that is promoted as a “Champion Product” by the Government of Thailand. Puerarin, the major bioactive component of this plant, has interesting pharmacodynamic activity against diseases of aging, but there is little pharmacokinetic information to support further study of this activity. Therefore, the aim of this study was to determine the pharmacokinetics of puerarin, including absorption, distribution, metabolism and elimination, in rats. Moreover, this is the first study to examine the tissue distribution of puerarin in the hippocampus, femur and tibia, and mammary gland based on recently the pharmacodynamic effects reported for neurodegenerative disease, osteoporosis, and breast cancer, respectively. Adult female rats were administered puerarin at 1 mg/kg intravenously or 5 and 10 mg/kg orally. Blood, tissue, urine and faeces were collected and analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Puerarin reached a maximum concentration in blood (140-230 µg/L) within 1 h after oral dosing, and had an absolute oral bioavailability of approximately 7%. Puerarin was widely distributed in several tissues, including the hippocampus, heart, lung, stomach, liver, mammary gland, kidney, spleen, femur, and tibia. Approximately 50% of the intravenous dose was excreted as glucuronide metabolites via the urinary route. These results are useful for the development of puerarin and *Pueraria candollei* var. *mirifica* as phytopharmaceutical products for the prevention and treatment of diseases of aging.

Keywords: Pharmacokinetics, puerarin, rats

ชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมบูรณ์ และเภสัชจลนศาสตร์การกระจายของสารพुरารินในหนู แรทเพศเมีย

พิลาตลักษณ์ ภู¹, นัฐพล หารรรษคุณาชัย¹, รัชณี รอดศิริ¹, สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์², พิสิฐ เข
มาวุฒม์^{1,3}

¹ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ศูนย์นวัตกรรมทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

กวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* var. *mirifica*) เป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยาของไทย และได้รับการสนับสนุนจากรัฐบาลประเทศไทยให้เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรต้นแบบ โดยมีสารพुरาริน (puerarin) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญของพืชชนิดนี้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย รวมถึงมีผลการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับโรคในผู้สูงอายุเช่น โรคกระดูกพรุนและโรคทางระบบประสาท แต่ข้อมูลการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์สำหรับสนับสนุนผลการศึกษาดังกล่าวยังมีข้อมูลไม่เพียงพอ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารพुरารินในหนูแรทเพศเมีย โดยให้สารพुरารินทางหลอดเลือดดำขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมและในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือด อวัยวะ ปัสสาวะ และอุจจาระภายหลังได้รับสาร และวิเคราะห์สารสำคัญโดยใช้เทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry จากการศึกษาพบว่าสารพुरารินมีระดับความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมา อยู่ในช่วง 140-230 มคก./ลิตร ภายใน 1 ชั่วโมง หลังได้รับสารในรูปแบบรับประทาน และมีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมบูรณ์ ประมาณร้อยละ 7 นอกจากนี้ สารพुरารินสามารถกระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ได้ดี รวมถึงสมองส่วนฮิปโปแคมปัส หัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร ตับ ต่อมไทรอยด์ ต่อมหมวกไต ม้าม กระดูกแข็ง และกระดูกอ่อน โดยพบว่าร้อยละ 50 ของขนาดที่ได้รับจะถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปพुरารินกลูคูโรไซด์ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับการวิจัยและพัฒนาสารพुरารินและสารสกัดกวาวเครือขาวให้เป็นผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร สำหรับการใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในผู้สูงอายุต่อไป

คำสำคัญ: เภสัชจลนศาสตร์, สารพुरาริน, หนูแรท

บทนำ

สารพุราริน (7,4-dihydroxy-8-C-glucosylisoflavone) เป็นสารสำคัญหลักที่พบในกวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* var. *mirifica*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Leguminosae โดยมีการศึกษาและนิยมนำมาใช้ในด้านการรักษาอาการหลังหมดประจำเดือนในเพศหญิง^{1,2} ป้องกันการเกิดภาวะกระดูกพรุน^{3,5} ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม⁶ การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในระดับพรีคลินิกและคลินิก พบว่าสามารถรักษาและป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด⁷ รวมถึงมีผลการรักษาที่เกี่ยวข้องกับโรคในผู้สูงอายุ เช่นภาวะกระดูกพรุน, เบาหวาน, โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคทางระบบประสาท^{3,8-10} แต่ข้อมูลการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ก่อนหน้านี้นี้ที่สอดคล้องและสนับสนุนกับผลการรักษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าวยังมีข้อมูลไม่เพียงพอ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ข้อมูลของการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของสารพุรารินในสัตว์ทดลอง สำหรับการให้สารในรูปแบบรับประทานมีระดับยาสูงสุด (T_{max}) อยู่ในช่วง 0.45-5.00 ชั่วโมง และค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) อยู่ในช่วง 0.80-1.00 ชั่วโมงหลังได้รับสาร¹¹⁻¹⁵ ข้อมูลการกระจายตัวในอวัยวะต่าง ๆ หลังได้รับสารพุราริน พบว่าเมื่อให้ในรูปแบบรับประทานขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่เวลา 1 ชั่วโมง จะพบการกระจายไปยังเนื้อเยื่อบริเวณตับ ม้าม ไต ปอด หัวใจ และสมอง โดยมี ค่า T_{max} 2.5 ชั่วโมง¹⁶ Prasain และคณะ (2004) พบว่าเมแทบอลิซึมของสารพุรารินเกิดผ่านขบวนการ hepatic phase I metabolism ผ่านทาง cytochrome P450 และถูกเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูป dihydroxylated puerarin¹⁷ อย่างไรก็ตาม Luo และคณะ (2010) รายงานว่าเมแทบอลิซึมของสารพุรารินเกิดผ่านขบวนการ phase II glucuronidation เป็นหลัก และถูกเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูป puerarin-4-O-glucuronide และ puerarin-7-O-glucuronide¹⁸ สารพุรารินถูกขับถ่ายออกนอกร่างกายในรูปแบบไม่เปลี่ยนแปลงทางปัสสาวะเป็นหลัก และมีการขับออกในรูปแบบ glucuronide metabolites ทางอุจจาระบางส่วน¹⁹

ทางคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมบูรณ์ การกระจายตัวของสารพุรารินในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ สมองส่วนฮิปโปแคมปัส หัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร ตับ ต่อม้าน้ำนม ไต ม้าม กระดูกแข้ง (tibia) และกระดูกน่อง (femur) เมแทบอลิซึม และการขับถ่ายออกนอกร่างกายทางปัสสาวะและอุจจาระของสารพุราริน โดยใช้หนูเพศเมียได้รับสารพุรารินทางหลอดเลือดดำขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยมีการวัดระดับสารสำคัญด้วยเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry เพื่อใช้ข้อมูลดังกล่าวสำหรับการวิจัยและพัฒนาสารพุราริน และกวาวเครือขาวให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปยาสมุนไพร (phytopharmaceuticals) สำหรับใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในผู้สูงอายุต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง และสารเคมี

หนูแรทเพศเมีย สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 16 สัปดาห์ น้ำหนัก 400-500 กรัม จำนวน 16 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยการเลี้ยงดูให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป และน้ำสะอาดอย่างไม่จำกัดปริมาณ ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50-60 ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง งานวิจัยนี้ได้รับการอนุเคราะห์สารฟูราลิน จาก ศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่อนุมัติ: 15-33-001, วันที่อนุมัติ: 22 เมษายน 2558)

วิธีการศึกษา

หนูทดลองถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว ได้รับสารละลายฟูราลินขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางหลอดเลือดดำบริเวณหาง หรือในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สำหรับยาเตรียมที่ใช้ในการทดลองทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารฟูราลินเตรียมโดยการละลายสารฟูราลินในสารละลาย 20% DMSO ใน 0.9% NSS จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือด (300 มคล.) ที่เวลา ก่อนได้รับยา, 0.08, 0.25, 0.50, 1, 2, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ โดยเก็บในหลอด heparinized จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไป centrifuge ที่ความเร็ว 1,500×g เป็นเวลา 10 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ มีการเก็บตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระทุก ๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระจะถูกเก็บแบ่งออกเป็น 3 ช่วงเวลา คือ 0-24, 24-48 และ 48-72 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

การศึกษาการกระจายตัวในอวัยวะต่าง ๆ หนูทดลองจำนวน 16 ตัวได้รับสารละลายฟูราลิน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมทางหลอดเลือดดำ จากนั้นทำการเก็บอวัยวะที่เวลา 0.08, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง หลังได้รับสารฟูราลิน โดยเก็บอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ สมองส่วนฮิปโปแคมปัส หัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร ตับ ต่อมไขมัน ไต ม้าม กระดูกแข็ง และกระดูกอ่อน ตัวอย่างอวัยวะจะถูกล้างด้วยน้ำเกลือเย็น และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โดยเครื่องมือ LC-MSMS

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารฟูราลินในตัวอย่างพลาสมา (50 มคล.) และปัสสาวะ (50 มคล.) ทำโดยการตกตะกอนโปรตีนกับเมทานอล (200 มคล.) ที่มีสาร glycyrrhetic acid (10 นก.) เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) สำหรับตัวอย่างอวัยวะต่าง ๆ และอุจจาระ (50 มก.) จะถูก homogenized และตกตะกอนโปรตีนกับเมทานอล (200 มคล.) ที่มีสาร glycyrrhetic acid (10 นก.) เป็นสารมาตรฐานภายใน สำหรับตัวอย่างกระดูกแข็ง และกระดูกอ่อน ต้องผ่านขบวนการ decalcified โดยการแช่สารละลาย 10%

EDTA/DW เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนกับเมทานอล (200 มคล.) ที่มีสาร glycyrrhetic acid (10 นก.) เป็นสารมาตรฐานภายในเช่นเดียวกัน

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารพูรารินกลูคูโรไนด์ (puerarin glucuronide) ทำโดยนำตัวอย่างพลาสมา (50 มคล.) และปัสสาวะ (50 มคล.) ใส่ลงในสารละลาย β -glucuronidase ความเข้มข้น 0.1 M ในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยเมทานอล (400 มคล.) ที่มีสาร glycyrrhetic acid (20 นก./400 มคล.) เป็นสารมาตรฐานภายใน สำหรับตัวอย่างอวัยวะต่าง ๆ และอุจจาระ (50 มก.) หลังจาก homogenized นำตัวอย่าง (50 มคล.) ใส่ลงในสารละลาย β -glucuronidase ความเข้มข้น 0.1 M ในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยเมทานอล (400 มคล.) ที่มีสาร glycyrrhetic acid (20 นก./400 มคล.) เป็นสารมาตรฐานภายในเช่นเดียวกัน

ตัวอย่างจะถูกนำไปวัดด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ปรับเปลี่ยนบางส่วนตามขั้นตอนของ Li et al. โดยค่าความถูกต้อง (accuracy) ของการตรวจวัดสารพูรารินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้ผลอยู่ในช่วง 93.60% – 107.80% ความแม่นยำ (precision) ในการวิเคราะห์ที่ไวมีค่า %RSD น้อยกว่า 15%¹¹ และ Prasain et al. โดยค่าความแม่นยำ (precision) ในการวิเคราะห์ที่ไวมีค่า %CV น้อยกว่า 15%¹⁷ ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากการศึกษาี้ มีค่า limited of detection เท่ากับ 0.16 มคก./ลิตร ค่า signal to noise ratio เท่ากับ 5 และมีค่า R² มากกว่า 0.99 เครื่องมือ LC-MS/MS ประกอบด้วย liquid chroma-tograph รุ่น Eksigent ekspert UHPLC 100 และ mass spectrometer รุ่น QTRAP 6500 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Analyst software version 1.6 (AB Sciex, USA) โดยใช้ stationary phase C₁₈ column (Synergi, Phenomenex Inc., USA) ส่วนของ mobile phase ประกอบด้วย 100% เมทานอล และ 0.2% formic acid ในน้ำ (pH 2.5) ในรูปแบบของ gradient elution โดยเริ่มด้วย 10% เมทานอล เป็นเวลา 0.5 นาที และเพิ่มขึ้นเป็น 90% เมทานอล ที่เวลา 1.5 นาทีจนถึง 3.5 นาที หลังจากนั้นลดลงเป็น 10% เมทานอล ที่เวลา 4 นาทีจนถึง 4.5 นาที โดยค่า retention time ของสารพูรารินเท่ากับ 1.58 นาที และค่า retention time ของสาร glycyrrhetic acid เท่ากับ 2.12 นาที

การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้ใช้โปรแกรม PK solution 2.0 (Summit research services, USA) โดยใช้การคำนวณหาค่าพาราทางเภสัชจลนศาสตร์ด้วยวิธี non-compartmental analysis ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่าเภสัชจลนศาสตร์ ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS ver. 16 (SPSS Inc, USA)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพและค่าทางชีวเคมี ก่อนได้รับสารพูเอาริน ก่อนได้รับยา และ 24 ชั่วโมงหลังได้รับสารละลายพูเอาริน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางหลอดเลือดดำบริเวณหาง หรือในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

Parameters	Puerarin					
	1 mg/kg IV		5 mg/kg PO		10 mg/kg PO	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
Physical appearance	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
AST (U/L)	61.67 ± 9.36	55.83 ± 2.90	57.67 ± 5.10	56.00 ± 6.84	55.60 ± 7.96	57.40 ± 5.12
ALT (U/L)	27.00 ± 26.18	11.20 ± 16.22	26.33 ± 18.78	13.17 ± 17.40	25.00 ± 13.92	12.17 ± 9.76
Creatinine (mg/dL)	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.10	0.21 ± 0.08

แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD), n=4

*p <0.05, ก่อนได้รับยา และ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารพูราริน และสาร puerarin glucuronide หลังได้รับสารละลายพูราริน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางหลอดเลือดดำ บริเวณหาง หรือในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

Parameters	Puerarin		
	1 mg/kg IV	5 mg/kg PO	10 mg/kg PO
Puerarin			
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	621.96 \pm 170.72	145.47 \pm 84.11	228.00 \pm 164.84
T_{max} (h)	N/A	0.19 \pm 0.09	0.33 \pm 0.21
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	291.47 \pm 108.05	109.45 \pm 60.61	204.57 \pm 157.47
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	292.23 \pm 108.93	109.58 \pm 60.55	212.20 \pm 157.50
Vd (L/kg)	1.16 \pm 0.56	101.59 \pm 119.57	90.17 \pm 18.28
MRT (h)	0.24 \pm 0.06	0.67 \pm 0.21	0.88 \pm 0.20
$T_{1/2}$ (h)	0.21 \pm 0.06	0.88 \pm 0.49	0.86 \pm 56.31
CL (L/h/kg)	5.43 \pm 2.66	65.06 \pm 52.75	74.79 \pm 0.17
Absolute bioavailability (%)	100	7.50	7.29
Puerarin glucuronide			
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	2,133.20	73.30	7,207.40
$AUC_{\text{puerarin glucuronide}} / AUC_{\text{puerarin}}$	7.35	0.67	34.65

แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD), n=4

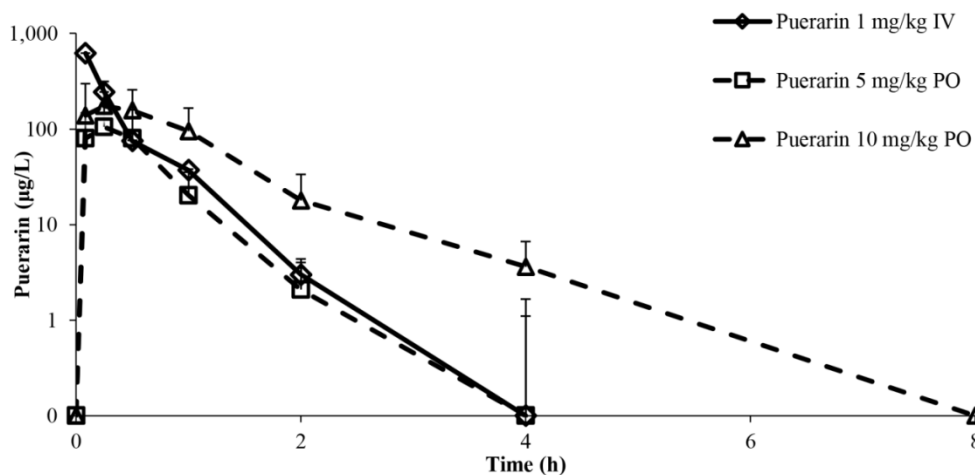
*p < 0.05, ระหว่างรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ตารางที่ 3 Percent recovery ของสารพูรารินและสาร puerarin glucuronide หลังได้รับสารละลายพูราริน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางหลอดเลือดดำบริเวณหาง หรือในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

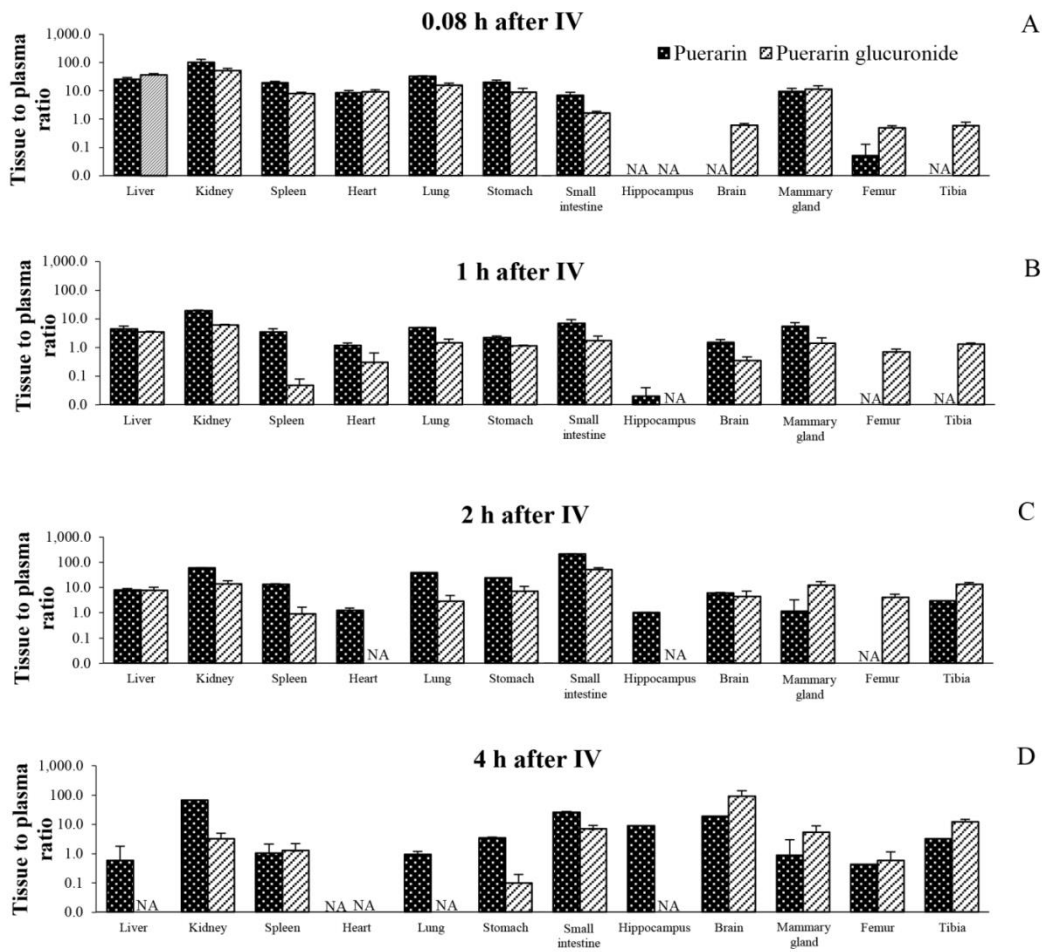
Recovery (%)	Puerarin		
	1 mg/kg IV	5 mg/kg PO	10 mg/kg PO
Puerarin			
Urine _{0.24h}	<1.00	<1.00	<1.00
Urine _{24.48h}	<1.00	<1.00	<1.00
Urine _{48.72h}	<1.00	<1.00	<1.00
Faeces _{0.24h}	<1.00	<1.00	<1.00
Faeces _{24.48h}	<1.00	<1.00	<1.00
Faeces _{48.72h}	<1.00	<1.00	<1.00
Puerarin glucuronide			
Urine _{0.24h}	47.53 ± 51.37	<1.00	12.13 ± 13.01
Urine _{24.48h}	2.38 ± 0.97*	<1.00	<1.00
Urine _{48.72h}	1.89 ± 0.45*	<1.00	<1.00
Faeces _{0.24h}	7.66 ± 2.51*	<1.00	1.94 ± 2.16
Faeces _{24.48h}	3.55 ± 0.55*	<1.00	<1.00
Faeces _{48.72h}	3.45 ± 0.80*	<1.00	<1.00

แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD), n=4

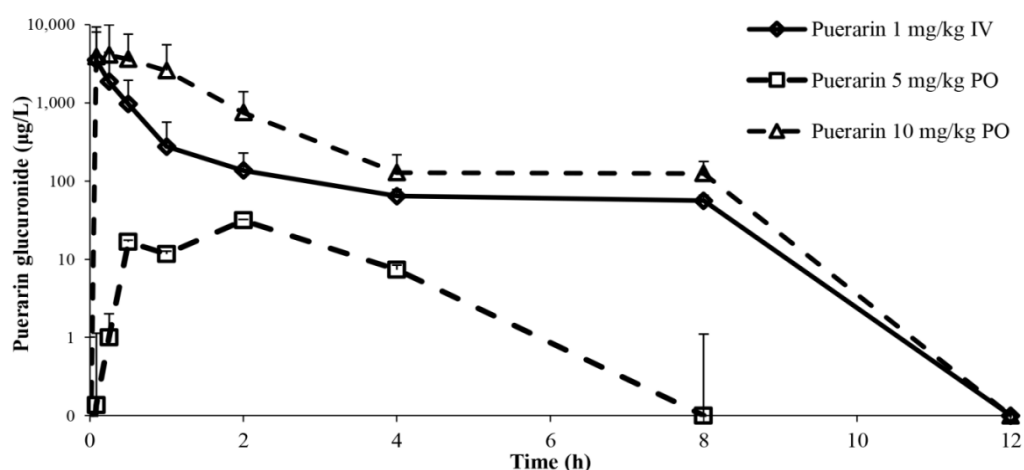
*p < 0.05, ระหว่างรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม



รูปที่ 1 ความเข้มข้นเฉลี่ยของสารพูรารินในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ หลังได้รับสารละลายพูราริน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางหลอดเลือดดำบริเวณหาง (□) หรือในรูปแบบรับประทานขนาด 5 (□) และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Δ); แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD), n=4



รูปที่ 2 ค่าความเข้มข้นของสารพูรารินในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา (tissue-to-plasma ratio) ของสารพูราริน (แท่งสีดำ) และสาร puerarin glucuronide (แท่งสีเทา) ในอวัยวะต่าง ๆ ที่เวลา 0.08 ชั่วโมง (A) 1.0 ชั่วโมง (B) 2.0 ชั่วโมง (C) และ 4.0 ชั่วโมง (D) หลังได้รับสารละลายพูราริน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางหลอดเลือดดำบริเวณหาง; แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD), n=4; NA = ค่าต่ำกว่าระดับการตรวจวัดได้



รูปที่ 3 ความเข้มข้นเฉลี่ยของพูราลินกลูคูโรไนด์ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ หลังได้รับสารละลายพูราลิน 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางหลอดเลือดดำบริเวณทาง (□) หรือในรูปแบบรับประทานขนาด 5 (□) และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Δ); แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD), n=4

ผลการทดลอง

ความทนได้และความเป็นพิษต่อดับและไตในหนูแรทที่ได้รับสารพูราลิน

หนูแรทเพศเมีย ได้รับสารพูราลินทางหลอดเลือดดำขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีลักษณะทางกายภาพที่ปกติ และค่าชีวเคมีจากตัวอย่างพลาสมา พบว่าค่าของ aspartate transaminase (AST) และ alanine transaminase (ALT) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับค่า creatinine ในเลือด ซึ่งแสดงผลถึงการทำงานของไต ทั้งก่อนได้รับสาร และ 24 ชั่วโมงหลังได้รับสารในหนูทุกตัว (ตารางที่ 1)

ความเข้มข้นของสารพูราลินในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ และค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมบูรณ์

รูปที่ 1 แสดงความเข้มข้นเฉลี่ยของสารพูราลินในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ โดยการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ด้วยวิธี non-compartmental analysis แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 2 จากการศึกษาพบว่าหลังได้รับสารพูราลินทางหลอดเลือดดำ ระดับความเข้มข้นของสารพูราลินในเลือดลดลงอย่างรวดเร็ว และถูกขับออกจากระบบไหลเวียนเลือดภายใน 4 ชั่วโมง โดยค่า C_{max} เท่ากับ 621.96 ± 170.72 มคก./ลิตร ค่าพื้นที่ใต้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับพูราลินในเลือดกับเวลา ($AUC_{0-\infty}$) เท่ากับ 292.23 ± 108.93 มคก.-ชม./ลิตร ค่าปริมาตรการกระจาย (V_d) เท่ากับ 1.16 ± 0.56 ลิตร/กิโลกรัม ค่าการกำจัด (CL) เท่ากับ 5.43 ± 2.66 ลิตร/ชั่วโมง/กิโลกรัม ค่าเวลาเฉลี่ยของสารที่ถูกกำจัดออกนอกร่างกาย (MRT) เท่ากับ 0.24 ± 0.06 ชั่วโมง และค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) เท่ากับ 0.21 ± 0.06 ชั่วโมง และหลังจากได้รับสารพูราลินในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมพบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารพูรา

รินเกิดขึ้นภายใน 1 ชั่วโมง และหลังจากนั้นระดับความเข้มข้นของสารพูรารินลดลงต่ำกว่าระดับการวิเคราะห์ได้ในช่วง 4-8 ชั่วโมงหลังได้รับสาร โดยค่า C_{max} อยู่ในช่วง 140-230 มกก./ลิตร ค่า $AUC_{0-\infty}$ อยู่ในช่วง 110-210 มกก.-ชม./ลิตร ค่า $T_{1/2}$ อยู่ในช่วง 0.86-0.88 ชั่วโมง โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างขนาดสารที่ได้รับแตกต่างกัน และพบว่าค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมพันธ์ ประมาณร้อยละ 7

การกระจายตัวในเนื้อเยื่อ

ผลการกระจายสารพูรารินไปยังอวัยวะต่าง ๆ ที่เวลา 0.08, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง หลังได้รับสารพูรารินทางหลอดเลือดดำ ขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แสดงดังรูปที่ 2 พบว่า ที่เวลา 0.08 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นของสารพูรารินในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาที่ไตสูงสุด ตามด้วยปอด กระเพาะอาหาร ตับ ต่อม้าน้ำนม และลำไส้เล็กตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวอยู่ในช่วง 10-100 เท่า และลดลงเป็น 1-10 เท่าที่ชั่วโมงที่ 1 ต่อมาหลังได้รับสารที่เวลา 2 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารพูรารินในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาสามารถตรวจพบได้ในเกือบทุกอวัยวะ รวมถึงสมองส่วนฮิปโปแคมปัส หัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร ตับ ต่อม้าน้ำนม ไต ม้าม และกระดุกแข็ง แต่ไม่พบในกระดุกน่อง ที่เวลา 4 ชั่วโมงยังคงพบการกระจายไปยังเนื้อเยื่อต่างของสารพูราริน และเพิ่มขึ้นในอวัยวะที่มีการแพร่ผ่านได้ยาก (low perfused organ) เช่น กระดุก

กระบวนการเมแทบอลิซึม

รูปที่ 3 แสดงความเข้มข้นของพูรารินกลูคูโรไนด์ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ หลังได้รับสารพูราริน พบว่า $AUC_{puerarin\ glucuronide} / AUC_{puerarin}$ มีค่าประมาณ 7 เท่า หลังได้รับสารพูรารินทางหลอดเลือดดำ และในส่วนของารได้รับสารพูรารินในรูปแบบรับประทานขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า ค่า $AUC_{puerarin\ glucuronide} / AUC_{puerarin}$ มีค่าประมาณ 30 เท่า ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการกระจายสารพูรารินไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ พบว่าที่เวลา 0.08 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารพูรารินกลูคูโรไนด์ต่อความเข้มข้นในพลาสมามีค่าสูงในเกือบทุกอวัยวะ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ค่าดังกล่าวจะลดลงในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ ยกเว้นในสมองและกระดุก

กระบวนการขับถ่าย

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละการขับถ่ายของสารพูรารินในรูปแบบไม่เปลี่ยนแปลง (unchange puerarin) ซึ่งพบสารพูรารินในรูปแบบไม่เปลี่ยนแปลงในปัสสาวะและอุจจาระต่ำกว่าร้อยละ 1 หลังจากที่ได้รับสารทั้งทางหลอดเลือดดำและในรูปแบบรับประทาน ในกลุ่มที่ได้รับสารพูรารินทางหลอดเลือดดำ พบว่าสารพูรารินกลูคูโรไนด์ถูกขับออกทางปัสสาวะเป็นหลัก ประมาณร้อยละ 50 ของปริมาณสารที่ได้รับใน 24 ชั่วโมงแรก และประมาณร้อยละ 15 ของสารพูรารินกลูคูโรไนด์ถูกขับออกมาในอุจจาระ ภายใน 72 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารพูรารินในรูปแบบรับประทาน ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าสารพูรารินกลูคูโรไนด์ถูกขับออกมาร้อยละ 10 ในปัสสาวะในช่วง 0-24 ชั่วโมงแรก

วิจารณ์

สารพุรารินมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องโรคในผู้สูงอายุ เช่น ภาวะกระดูกพรุน เบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคทางระบบประสาท⁵ แต่ข้อมูลการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ก่อนหน้านี้ที่สอดคล้องและสนับสนุนกับผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าวยังมีข้อมูลไม่เพียงพอ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการทำการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมบูรณ์ การกระจายตัวในอวัยวะต่าง ๆ เมแทบอลิซึม และการขับถ่ายออกทางปัสสาวะและอุจจาระของสารพุราริน

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เมื่อให้สารพุรารินในรูปแบบรับประทานจะให้ค่า T_{max} อยู่ในช่วง 0.45-5.00 ชั่วโมง¹¹⁻¹⁵ แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่า ค่า T_{max} หลังได้รับสารพุรารินโดยวิธีป้อนทางปากมีค่าเพียง 0.2-0.3 ชั่วโมง โดยค่า T_{max} ที่แตกต่างกันน่าจะเกิดจากการเตรียมตำรับที่แตกต่างกัน โดยตำรับที่เตรียมในการศึกษานี้เตรียมในรูปแบบสารละลายใส ส่งผลให้เกิดการดูดซึมอย่างรวดเร็วบริเวณทางเดินอาหาร และมีค่า T_{max} ที่สั้นลง นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงเป็นพุรารินกลูคูโรไนด์อย่างรวดเร็วที่เวลา 0.08 ชั่วโมง ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารพุรารินเกิดการเปลี่ยนแปลงผ่านขบวนการ glucuronidation อย่างรวดเร็วและปริมาณของสารพุราริน รวมถึงสารพุรารินกลูคูโรไนด์ ที่พบเป็นสัดส่วนที่แปรผันตรงกับขนาดของสารที่ได้รับ โดยในส่วนของ การได้รับสารพุรารินในรูปแบบรับประทานขนาด 5 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า ค่า $AUC_{puerarin\ glucuronide} / AUC_{puerarin}$ มีค่าประมาณ 0.67 เท่า และ 30 เท่าตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้มีการรายงานพบว่าสารพุรารินมีการดูดซึมในรูปแบบ passive transport เป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าสารพุรารินเป็นสารตั้งต้น (substrate) ของ P-glycoprotein (P-gp) และ multi-resistance protein (MRP) ซึ่งเป็น efflux transporter²¹ และ สารพุรารินถูกจัดอยู่ใน Biopharmaceutics Classification IV ซึ่งเป็นสารที่มีค่าการละลายต่ำ และการแพร่ผ่านได้ต่ำ มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน แตกตัวได้ในที่มีสภาวะ pH สูง สารพุรารินจึงมีค่าการละลายที่ต่ำในสภาวะเป็นกรดเช่นในกระเพาะอาหาร และส่งผลต่อการตกตะกอนที่บริเวณทางเดินอาหาร²⁰ ดังนั้นจึงส่งผลให้สารพุรารินมีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมบูรณ์เพียงร้อยละ 7

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ไม่พบรายงานการกระจายสารพุรารินไปยังเนื้อเยื่อ สมองส่วนฮิปโปแคมปัส กระดูก ต่อมไทรอยด์ ซึ่งในการศึกษานี้ พบว่าสารพุรารินสามารถกระจายไปยังเนื้อเยื่อเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ปริมาณการกระจายของสารพุราริน (V_d) มีค่าประมาณ 1.16 ลิตร/กก. แสดงให้เห็นว่าสารพุรารินสามารถกระจายไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ดี และสอดคล้องกับคุณสมบัติทางเคมีของสาร รวมถึงค่า lipophilicity ที่สูง ($XlogP$ 1.95) และค่าการละลายน้ำที่ต่ำ (0.46 มก./มล.) และความเข้มข้นดังกล่าวอยู่ในระดับที่สามารถมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทและโรคกระดูกพรุน

กระบวนการเมแทบอลิซึมของสารพุราริน พบว่าปริมาณสารพุรารินกลูคูโรไนด์ ที่เกิดขึ้นมีค่า $AUC_{puerarin\ glucuronide} / AUC_{puerarin}$ เท่ากับ 7 หลังได้รับสารพุรารินทางหลอดเลือดดำ และ 30 เท่าหลังได้รับสารในรูปแบบรับประทาน ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (ตารางที่ 2) โดยปริมาณ

พูรารินกลูคูโรไซด์ ที่ตรวจพบในตัวอย่างชีวภาพ เกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferases¹⁷ จากการศึกษาที่เราพบว่า การเกิดขบวนการ glucuronidation เกิดขึ้น ที่เวลา 0.08 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าขบวนการ glucuronidation เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสารพูรารินถูกเปลี่ยนไปเป็นสารพูรารินกลูคูโรไซด์จำนวนมาก ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเกิดกระบวนการ first pass metabolism อาจส่งผลให้ลดการดูดซึมปริมาณสารพูรารินในระบบไหลเวียนเลือด และส่งผลให้เกิดค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมบูรณ์ของสารพูรารินที่ค่อนข้างต่ำ

ร้อยละการขับถ่ายของสารพูรารินในรูปแบบไม่เปลี่ยนแปลง (unchange puerarin) ในปัสสาวะและอุจจาระน้อยกว่าร้อยละ 1 ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมงหลังได้รับสาร แสดงให้เห็นว่า สารพูรารินถูกเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปแบบ glucuronide ก่อนที่จะถูกขับถ่ายออกผ่านทางท่อน้ำดี หรือทางไต และประมาณร้อยละ 50 ของปริมาณสารที่ได้รับขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถูกตรวจพบในปัสสาวะในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และประมาณร้อยละ 1-10 หลังได้รับสารในรูปแบบรับประทาน ถูกขับออกผ่านทางปัสสาวะในรูปแบบ glucuronide

สรุป

จากการศึกษาพบว่าสารพูรารินมีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมบูรณ์ ประมาณร้อยละ 7 สารพูรารินสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆได้ดี รวมถึงสมองส่วนฮิปโปแคมปัส, หัวใจ, ปอด, กระเพาะอาหาร, ตับ, ต่อมไทรอยด์, ไต, ม้าม, กระดูกแข็ง และกระดูกอ่อน โดยสารพูรารินประมาณร้อยละ 50 ของขนาดสารที่ได้รับจะถูกขับออกผ่านทางปัสสาวะ ในรูปของ puerarin glucuronide ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับการวิจัยและพัฒนาสารพูราริน และสารสกัดกวางเครือขาวให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปยาสมุนไพร (phytopharmaceuticals) สำหรับใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในผู้สูงอายุต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนเมธีวิจัย จุฬาฯ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (ศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยจิตรนนท์)

เอกสารอ้างอิง

1. Lamlertkittikul S, Chandeying V. Efficacy and safety of *P. mirifica* (Kwao Kruea Khao) for the treatment of vasomotor symptoms in perimenopausal women: Phase II study. J Med Assoc Thai. 2004;87:33-40.
2. Chandeying V, Sangthawan M. Efficacy comparison of *P. mirifica* against conjugated equine estrogen with/without medroxyprogesterone acetate in the treatment of climacteric symptoms in perimenopausal women: phase III study. J Med Assoc Thai. 2007;90:1720-6.
3. Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. Preventive

- effects of *P. mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas*. 2008;59:137-48.
4. Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. *P. mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. *Maturitas*. 2007;56:322-31.
 5. Suthon S, Jaroenporn S, Malaivijitnond S. Anti-osteoporotic effects of *P. candollei* var. *mirifica* on bone mineral density and histomorphometry in estrogen-deficient rats. *J Nat Med*. 2016;70:225-33.
 6. Cherdshewasart W, Panriansaen R, Picha P. Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ER α and ER β . *Maturitas*. 2007;58:174-81.
 7. Wattanapitayakul SK, Chularojmontri L, Srichirat S. Effects of *P. mirifica* on vascular function of ovariectomized rabbits. *J Med Assoc Thai*. 2005;88:S21.
 8. Wong KH, Li GQ, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Chan K. Kudzu root: traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases. *J Ethnopharmacol*. 2011;134:584-607.
 9. Anukulthanakorn K, Malaivijitnond S, Jaroenporn S, Kitahashi T, Watanbe G, Parhar IS. Neurotherapeutic effects of *P. mirifica* extract in the early and late stage of cognitive impaired rats. *Phytother Res*. 2016;30:929-39.
 10. Cherdshewasart W, Traisup V, Picha P. Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *P. mirifica* by MCF-7 proliferation assay. *J Reprod Dev*. 2008;54:63-67.
 11. Li Y, Pan W, Chen S, Xu H, Yang D, Chan A. Pharmacokinetic, tissue distribution, and excretion of puerarin and puerarin-phospholipid complex in rats. *Drug Dev Ind Pharm*. 2006;32:413-22.
 12. Ren F, Jing Q, Shen Y, Ma H, Cui J. Quantitative determination of puerarin in dog plasma by HPLC and study on the relative bioavailability of sustained release tablets. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;41:549-53.
 13. Zhiguo Y, Xiaoxia G, Hongxia Y, Mingyan M, Xiaohui C, Kaishun B. Simultaneous determination of safflor yellow A, puerarin, daidzein, ginsenosides (Rg1, Rb1, Rd), and notoginsenoside R1 in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;46:327-36.
 14. Liu X, Zhi H, Du F, Ye Z, Wang N, Qin W, et al. A HPLC-UV method for the determination of puerarin in rat plasma after intravenous administration of PEGylated puerarin conjugate. *J Chromatogr B*. 2010;878:3297-302.
 15. Cao L, Pu J, Cao QR, Chen BW, Lee BJ, Cui JH. Pharmacokinetics of puerarin in pregnant rats at different stages of gestation after oral administration. *Fitoterapia*. 2013;86:202-7.
 16. Luo CF, Yuan M, Chen MS, Liu SM, Zhu L, Huang BY, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solid lipid nanoparticles following oral administration. *Int J Pharm*. 2011;410:138-44.

17. Prasain JK, Jones K, Brissie N, Moore R, Wyss JM, Barnes S. Identification of puerarin and its metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2004;52:3708-12.
18. Luo CF, Yuan M, Chen MS, Liu SM, Ji H. Metabolites of puerarin identified by liquid chromatography tandem mass spectrometry: similar metabolic profiles in liver and intestine of rats. *J Chromatogr B.* 2010;878:363-70.
19. Yasuda T, Kano Y, Saito K, Ohsawa K. Urinary and biliary metabolites of puerarin in rats. *Biol Pharm Bull.* 1995;18:300-3.
20. Li H, Dong L, Liu Y, Wang G, Wang G, Qiao Y. Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats. *Int J Pharm.* 2009;466:133-8.
21. Liang XL, Zhao LJ, Liao ZG, Zhao GW, Zhang J, Chao YC. Transport properties of puerarin and effect of *Radix Angelicae Dahuricae* extract on the transport of puerarin in Caco-2 cell model. *J. ethnopharmacol.* 2012;144:677-82.

B15**Quantitative Determination of Colistin in Human Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection for Therapeutic Drug Monitoring****Maneerut Limjariyakul¹, Pajaree Chariyavilaskul², Supeecha Wittayalertpanya²**¹*Inter-department of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*²*Clinical pharmacokinetic research unit in renal and cardiovascular disease, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand***Abstract**

Colistin, an old antibiotic discovered 60 years ago, is re-introduced in clinical practice because of the higher prevalences of nosocomial infections and multidrug resistance. Colistin withdrawal due to its toxicities leaves the knowledge gaps unfilled. Drug information and dosage guidelines of colistin have not been well defined. In this study, a simple HPLC method, modified from previous studies, was validated for the purpose of therapeutic drug monitoring (TDM) of colistin. Colistin sulfate and netilmicin sulfate were used as the reference standard and the internal standard, respectively. Colistin was extracted from plasma sample by deproteinization, solid-phase extraction with fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) derivatization and separated by reverse phase-HPLC using acetonitrile, tetrahydrofuran and water (50:25:25, v/v/v) as mobile phase. The calibration curve over the concentration range 0.41447 – 13.26301 mg/L showed good linear correlation, $R^2 > 0.998$. The sensitivity of the method was 0.41447 mg/L. No interference was detected near the retention times of colistin and netilmicin. The intra-day and inter-day accuracy were 98.93 – 112.23% and 110.18 – 112.97%, respectively. The intra-day and inter-day precision were 2.70 – 11.10% and 7.82 – 14.30%, respectively. The propose method demonstrated good sensitive, selective, precise and accurate, met the US FDA standard of bioanalysis method validation and appropriated for therapeutic drug monitoring study.

Keywords: Colistin, HPLC, therapeutic drug monitoring

วิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณโคลิสตินในพลาสมามนุษย์เพื่อการตรวจติดตามระดับยา

มณีนรัตน์ ลิ้มจรรย์กุล¹, ปาจริย์ จรรย์วิลาศกุล², สุปิชา วิทย์เลิศปัญญา²

¹สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

โคลิสตินเป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกค้นพบเมื่อ 60 กว่าปีก่อน และได้ถูกนำกลับมาใช้ใหม่เนื่องจากปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลและปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้น การเลิกใช้โคลิสตินในอดีตจากสาเหตุความเป็นพิษของยาส่งผลให้ข้อมูลและการศึกษาเกี่ยวกับยานี้ยังมีไม่เพียงพอ ข้อกำหนดของแนวทางการใช้ยาก็ยังไม่ชัดเจน การศึกษานี้จึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์จากการศึกษาก่อนหน้าเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณโคลิสตินในพลาสมามนุษย์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการตรวจติดตามระดับยาในผู้ป่วย การศึกษานี้ใช้โคลิสตินซัลเฟตและเนทิลมัยซินซัลเฟตเป็นสารมาตรฐานและสารมาตรฐานภายในตามลำดับ สกัดโคลิสตินจากตัวอย่างด้วยกระบวนการตกตะกอนโปรตีน, การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ 9-ฟลูออเรนิลเมธอกซีคาบอนิลคลอไรด์ (FMOC-Cl) ในเฟสของแข็ง และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สารละลายอะซีโตรไนไตรล์, เตตระไฮโดรฟูแรน และน้ำ (50:25:25 โดยปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ กราฟมาตรฐานของโคลิสตินครอบคลุมความเข้มข้นตั้งแต่ 0.41447 - 13.26301 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ค่า $R^2 > 0.998$ ความไวของวิธีวิเคราะห์มีค่า 0.41447 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่พบพีการบกวน ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันเท่ากับ 98.93 - 112.23% และ 100.18 - 112.97% ตามลำดับ ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันเท่ากับ 2.70 - 11.10% และ 7.82 - 14.30% ตามลำดับ วิธีนี้มีความไว, ความจำเพาะ, ความถูกต้องและแม่นยำตามมาตรฐานการวิเคราะห์สารทางชีวภาพของ US FDA มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาการตรวจติดตามระดับยาโคลิสตินในพลาสมา

คำสำคัญ: โคลิสติน, เอชพีแอลซี, การตรวจติดตามระดับยา

Introduction

Colistin was revived since many years ago. It is used as the 'last-resort' antibiotic for nosocomial infections caused by dreaded multidrug-resistant gram-negative bacteria such as *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*.¹ Two salt forms of colistin are commercially available, colistin sulfate and colistin methanesulfonate (CMS). CMS, less potent and less toxic prodrug, is the most commonly used form for intravenous infusion in clinical practice.² Colistin, a cationic polypeptide antibiotic, is composed of two major components, colistin A and colistin B, and more than 30 minor components.³ Bacterial membrane disruption was assumed to be the concentration-dependent bactericidal action of colistin.^{2, 4} Clearance mechanism of colistin is still unclear, extensive renal tubular reabsorption was reported by previous studies.^{5, 6} The most common adverse effect of colistin is nephrotoxicity and variable incidence rates were reported by previous studies. Other adverse effect, rarely reported, is neurotoxicity including paresthesia, apnea and neuromuscular blockade.¹ While higher rates of nosocomial infection lead to the increased use of colistin, PK/PD information and dosage guidelines have not been well defined. Recently, inter- individual variability characteristics of plasma concentrations and geometric mean apparent clearance of colistin were reported in multi-center population pharmacokinetic study.⁷ Despite, the physician-selected CMS daily dose at the upper limit of the product recommendation in patients with moderate to good renal function, the average steady-state plasma concentrations were insufficient to achieve the desired target concentration. In addition, the higher dose in patients with good renal function might result in a higher proportion of CMS at the kidney increasing intrarenal conversion to colistin and renal toxicity.⁷ Therapeutic drug monitoring (TDM) can be useful for managing drug dosage and plasma concentration to achieve maximum efficacy and avoid toxicity.⁸ Lately, several case reports⁹⁻¹¹ provided benefits of monitoring colistin plasma trough concentration in CMS treatment. Likewise, after a week of CMS treatment, trough level of plasma colistin was defined as the independent risk factor and the only predictor for colistin-associated acute kidney injury.¹²

Though discovered 40 years ago, colistin was withdrawn due to its nephrotoxicities in the 'golden age' of antibiotic medicinal chemistry.^{13, 14} A paucity of accurate and precise methods for colistin determination is one of major issues caused limitation in PK/PD studies. In 2001, a reliable and validated HPLC method for analysis colistin in human plasma was published.¹⁵ Colistin extraction on solid phase extraction C-18 cartridge using FMOC-Cl was first described with advantages, including fluorescent derivatizability of both primary and secondary amine groups of colistin, stability of FMOC derivatives at room temperature and simplicity of HPLC apparatus. In 2008, the measurement of polymyxin B in human plasma using a validated HPLC method was first developed, based on the HPLC method for colistin previously reported¹⁵, with a smaller sample volume, a simpler step of sample pretreatment and a shorter run time.¹⁶ Polymyxin B and colistin (polymyxin

E) are in the same class of antibiotics, polymyxins. Their structure are almost similar with the only one amino acid difference.¹³ In this study, a simple HPLC method, modified from two previous studies^{15,16}, was validated for the purpose of therapeutic drug monitoring of colistin.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

Colistin sulfate was U. S. Pharmacopoeia reference standard (USP Convention). Netilmicin sulfate (internal standard) was European Pharmacopoeia reference standard (European Directorate for the Quality of Medicines; EDQM). The derivatizing reagent, 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) was from Sigma-Aldrich. Methanol (Merck), acetonitrile and tetrahydrofuran (Honeywell Burdick & Jackson) were HPLC grade. Boric acid (Vivantis), sodium hydrogen carbonate (Carlo Erba Reagenti) and sodium hydroxide (Merck) were analytical grade. Water was purified with a Labconco WaterPro PS Polishing Systems to 18.2 MΩ·cm. 1% (w/w) sodium hydrogen carbonate solution (pH 9.2) was freshly prepared by dissolving the proper amount of sodium hydrogen carbonate in water and adjusting pH with 10% (w/w) sodium hydroxide solution. The derivatizing mixture was freshly prepared by mixing 30 µL of 100 mM FMOC-Cl in acetonitrile and 80 µL of methanol.

HPLC apparatus

Colistin was determined by a Shimadzu Prominence HPLC system equipped with LC-20AB pump, DGU-20A5 degasser, SIL-20AC autosampler, CTO-20AC column oven, CBM-20A interface and RF-10AXL fluorescence detector. The chromatographic separation was performed on an Onyx Monolithic C18 column (2 µm, 100 × 4.6 mm ID) coupled with an Onyx Monolithic C18 guard column (5 × 3.0 mm) (Phenomenex).

Sample pre-treatment, pre-column derivatization and HPLC analysis

Plasma samples were stored in a -80°C freezer and thawed at room temperature before processing. 100 µL of plasma was mixed with 10 µL of the internal standard (40 mg/L netilmicin sulfate) and deproteinized by an equal volume of acetonitrile. After centrifugation at 5,000 ×g for 10 minutes, the supernatant was transferred to a conditioned SPE cartridge.

Pre-column derivatization was performed on a SPE Vacuum Manifold (GL Sciences). A reverse phase C-18 sorbent of the SPE cartridges (100 mg, Sep-Pak, Waters) was properly washed and wetted with acetone (2 mL) then equilibrated with sodium hydrogen carbonate solution (2 mL). The supernatant was loaded onto the conditioned cartridge followed by washing with sodium hydrogen carbonate solution (1 mL) to remove interferences. 110 µL of derivatizing mixture was added, after 10 minutes of derivatization reaction, the cartridge was dried out. Following elution with

900 μ L of acetone, the eluent was mixed with 0.2 M boric acid (600 μ L) and acetonitrile (500 μ L), and kept at 25 °C in the autosampler until injection.

For HPLC analysis, 30 μ L of sample was injected, colistin derivatives and the internal standard were eluted isocratically using acetonitrile-tetrahydrofuran-water mixture (50:25:25, v/v/v) as mobile phase at flow rate 1.0 mL/min. Column oven temperature was set at 25 °C. The excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were set at 260 and 315 nm.

Validation procedures

Standard solutions were prepared by diluting colistin sulfate over the concentration range 5 - 160 mg/L, of which the final concentrations of colistin sulfate were over the range 0.5 - 16.0 mg/L (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0 and 16.0 mg/L). The accuracy of each calibration point when back-calculated should be within 85 - 115% [%accuracy = (actual concentration / nominal concentration) \times 100] with the exception of the lowest concentration on the calibration curve, for which accuracy should be within 80 - 120% of the nominal concentration.

The selectivity of the method was tested by comparing chromatograms of blank plasma obtained from 6 different sources with plasma spiked with colistin sulfate and the internal standard.

The intra-day and inter-day accuracy and precision of the method were investigated by 5-replicate analysis per concentration of samples spiked with the colistin sulfate standard solutions at 3 different concentrations (15, 30 and 120 mg/L) and over 3 consecutive days (in 3 separate analytical runs). For each concentration, 5 replicates of samples were performed and calculated with the calibration curve obtained daily. Accuracy was shown as percentage value [%accuracy = (actual concentration / nominal concentration) \times 100] and should be within 85 - 115%. Precision was expressed as percent coefficient of variation (CV) [CV (%) = (standard deviation / mean) \times 100] and should not exceed 15%.

The sensitivity of the method was tested by 5-replicate analysis of samples spiked with the lowest colistin sulfate standard solution, at concentration of 5 mg/L. Accuracy was shown as percentage value [%accuracy = (actual concentration / nominal concentration) \times 100] and should be within 80 - 120%. Precision was expressed as percent coefficient of variation (CV) [CV (%) = (standard deviation / mean) \times 100] and should not exceed 20%.

Results

Under the HPLC condition, the retention times of the internal standard, colistin A and colistin B were 6.53, 9.27 and 10.94 minutes. The chromatograms for blank plasma from a healthy volunteer, point 4 of colistin calibration curve and

trough plasma sample from a patient receiving colistin methanesulfonate, obtained in 19.5 minutes, are shown in Figure 1.

Peak area of colistin was calculated as the sum of peak areas of two major components, colistin A and colistin B. After multiplying each level of the final concentrations of colistin sulfate by 1163/1403, the calibration curves of colistin were constructed, not forced through the origin, by weighted ($1/x$) least-squares linear regression of the peak area ratios versus the calculated colistin concentrations. The concentrations of colistin on the calibration curve were 0.41447, 0.82894, 1.65788, 3.31575, 8.28938 and 13.26300 mg/L. Linearity was expressed as the coefficient of determination (R^2). All the calibration curves showed good linear correlation, R^2 was > 0.99 .

From all blank plasma chromatograms obtained from 6 different sources, there were no interfering peaks detected near the retention times of the compounds of interest indicating the selectivity of the method.

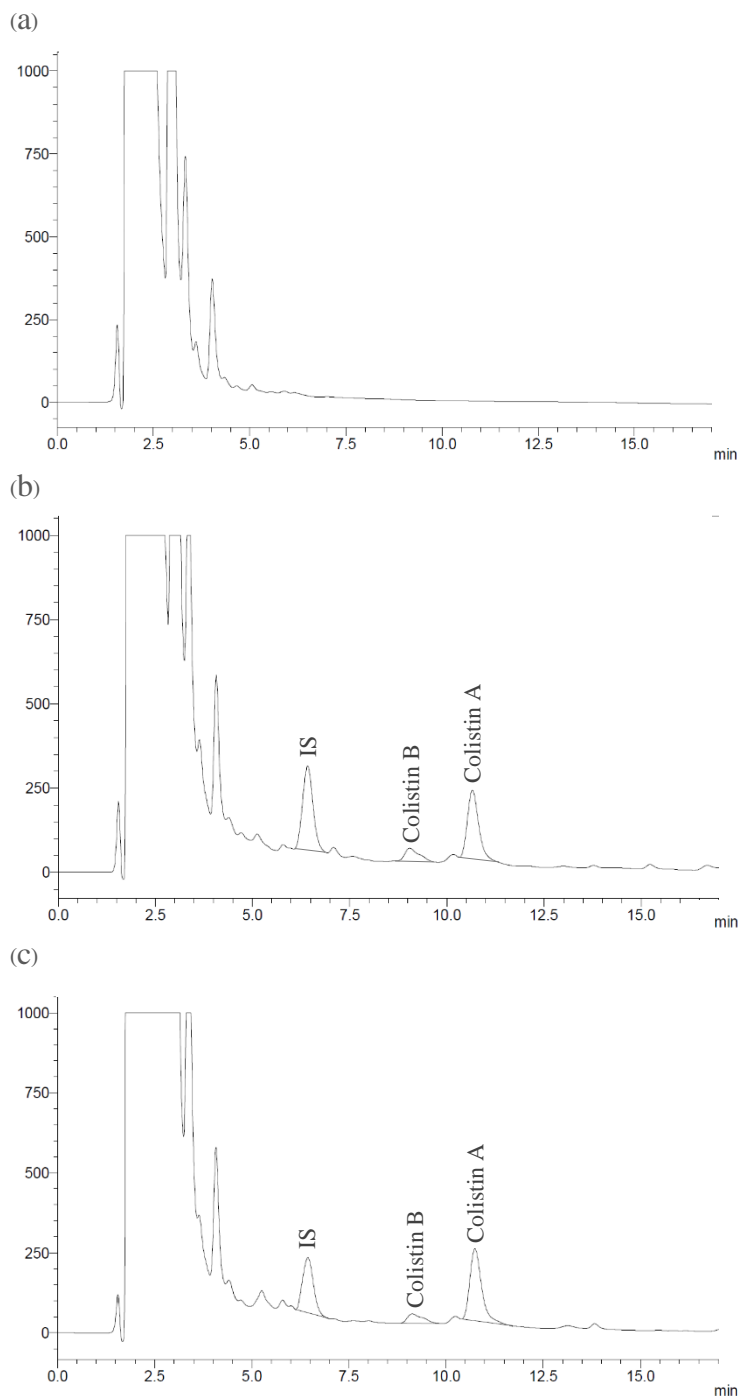


Figure 1. Typical chromatograms obtained with fluorescence detection for blank plasma (a), point 4 of colistin calibration (b) and (c) plasma from patient receiving colistin methanesulfonate (IS: internal standard), The retention times of the internal standard, colistin A and colistin B were 6.53, 9.27 and 10.94 minutes

Accuracy and precision of this method were acceptable. Determined during a single analytical run, the intra-day accuracy were between 98.93 and 112.23% and the intra-day (CV) were between 2.70 and 11.10. Investigated in three separate analytical runs, the inter-day accuracy were between 100.18 and 112.97% and the inter-day precision were between 7.82 and 14.30. (Table 1)

The lower limit of quantification (LLOQ) for colistin, obtained from analysis of plasma spiked with 5 mg/L colistin sulfate, was 0.41447 mg/L. Accuracy and precision were 99.92% and 3.82%, respectively.

Table 1. Intra-day and inter-day accuracy and precision.

Level	Colistin conc. (mg/L)	Intra-day analysis (n=5)		Inter-day analysis (n=15)	
		%accuracy	%CV	%accuracy	%CV
LLOQ	0.41447	99.92	3.82	-	-
Low	1.24341	98.93	2.70	100.18	14.30
Medium	2.48681	110.88	11.10	112.97	7.82
	9.47256	112.23	4.45	107.98	9.10

Discussion

The concentrations of colistin were calculated by multiplying the obtained colistin sulfate plasma concentrations by 1163/1403 before constructed on the calibration curve (1163 is the average molecular weight of colistin A and colistin B, the two major component of colistin, and 1403 is the average molecular weight of colistin sulfate).¹⁷ A run time of 19.5 minutes was very similar to previous methods¹⁷⁻¹⁹ under the simplified procedures of sample deproteinization and SPE cartridge conditioning. Two steps of SPE cartridge conditioning were introduced with acetone and sodium hydrogen carbonate. Increased yield of FMOC-Cl derivatives was noticed at pH 9.2 when compared with pH 10 of sodium hydrogen carbonate. At 25 °C in the autosampler, the size of unwanted peaks was reduced whereas the derivatives of internal standard, colistin A and colistin B were stable for at least 96 hours compared with immediate analysis after elution. Pharmacokinetic and animal model studies provided an average plasma concentration of colistin at steady state ($C_{ss,avg}$) of 2 - 2.5 mg/L.^{7, 20} Recently, two case reports provided therapeutic drug monitoring for successful colistin treatment. One, colistin plasma trough concentration of 1.1 mg/L was determined on day 3 and day 4 after colistin initiation in patient with liver abscess caused by MDR-*Pseudomonas aeruginosa*.¹⁰ Two, colistin plasma trough concentration of 7.88 mg/L on day 13 after colistin initiation was determined in the systemic lupus erythematosus patient who had bacteremia due to MDR-

Pseudomonas aeruginosa with decreased CrCL and colistin plasma trough concentration were 0.61 mg/L on day 20 with the recovery of CrCL.¹¹ The concentration range of the calibration curve (0.41447 – 13.26300 mg/L) was chosen on the basis of covering the expected range of colistin plasma trough concentration for therapeutic drug monitoring study.

Recent studies²¹⁻²³ suggested that the higher colistin dosage is associated with the effectiveness. Trough plasma concentration monitoring of colistin supported the decision process of lowering the colistin dosage which was beneficial to improving impaired renal function and still efficacious.¹¹ Since, colistin is extensively reabsorbed in renal tubules and CMS is mainly cleared through renal tubular secretion, the colistin plasma concentration may also be affected by instability of renal function. Therefore, a previous case report suggested that the role and the clinical utility of colistin therapeutic drug monitoring should be further investigated in a larger population of patients with fluctuating renal function.⁹ The previous study assessed the stability of colistin and CMS under different storage conditions and provided that when stored at -80 °C or -70 °C, colistin concentration in colistin-spiked plasma was stable up to 6-8 months of storage.²⁴ Limitation of this study, recovery of interesting compounds were not methodically evaluated.

Conclusion

The propose method demonstrated good sensitive, selective, precise and accurate, met the US FDA standard of bioanalysis method validation and appropriated for therapeutic drug monitoring.

Acknowledgements

Research was conducted in the Clinical Pharmacokinetics Research Unit in Renal and Cardiovascular Diseases, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine. This work was financially supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (GCUGR1125594057M) and Ratchadaphiseksomphot Fund (RA59/054).

References

1. Javan AO, Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *European journal of clinical pharmacology*. 2015;71(7):801-10.
2. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases*. 2005;40(9):1333-41.

3. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents*. 2005;25(1):11-25.
4. Owen RJ, Li J, Nation RL, Spelman D. In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(3):473-7.
5. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC, Coulthard K. Use of high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulfate in rats following intravenous administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(5):1766-70.
6. Ma Z, Wang J, Nation RL, Li J, Turnidge JD, Coulthard K, et al. Renal disposition of colistin in the isolated perfused rat kidney. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(7):2857-64.
7. Garonzik S, Li J, Thamlikitkul V, Paterson D, Shoham S, Jacob J, et al. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(7):3284-94.
8. Kang J-S, Lee M-H. Overview of therapeutic drug monitoring. *The Korean journal of internal medicine*. 2009;24(1):1-10.
9. Bode-Böger SM, Schopp B, Tröger U, Martens-Lobenhoffer J, Kalousis K, Mailänder P. Intravenous colistin in a patient with serious burns and borderline syndrome: the benefits of therapeutic drug monitoring. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;42(4):357-60.
10. Yaita K, Sameshima I, Takeyama H, Matsuyama S, Nagahara C, Hashiguchi R, et al. Liver abscess caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* treated with colistin; a case report and review of the literature. *Internal medicine*. 2013;52(12):1407-12.
11. Yamada T, Ishiguro N, Oku K, Higuchi I, Nakagawa I, Noguchi A, et al. Successful colistin treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection using a rapid method for determination of colistin in plasma: usefulness of therapeutic drug monitoring. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2015;38(9):1430-3.
12. Sorlí L, Luque S, Grau S, Berenguer N, Segura C, Montero MM, et al. Trough colistin plasma level is an independent risk factor for nephrotoxicity: a prospective observational cohort study. *BMC infectious diseases*. 2013;13(1):380.
13. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet infectious diseases*. 2006;6(9):589-601.
14. Walsh CT, Wencewicz TA. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *The Journal of antibiotics*. 2014;67(1):7-22.

15. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K, Johnson DW. A simple method for the assay of colistin in human plasma, using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate in solid-phase extraction cartridges and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001;761(2):167-75.
16. Cao G, Chiu F, Zavascki AP, Nation RL, Li J. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatography assay for polymyxin B in human plasma. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(5):1009-14.
17. Li J, Coulthard K, Milne R, Nation RL, Conway S, Peckham D, et al. Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(6):987-92.
18. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K, Valentine J. Simple Method for Assaying Colistin Methanesulfonate in Plasma and Urine Using High-Performance Liquid Chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(10):3304-7.
19. Chepyala D, Tsai I-L, Sun H-Y, Lin S-W, Kuo C-H. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the accurate quantification of colistin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2015;980:48-54.
20. Landersdorfer CB, Nation RL. Colistin: how should it be dosed for the critically ill? *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36(1):126-35.
21. Dalfino L, Puntillo F, Mosca A, Monno R, Spada ML, Coppolecchia S, et al. High-dose, extended-interval colistin administration in critically ill patients: is this the right dosing strategy? A preliminary study. *Clin Infect Dis*. 2012;54(12):1720-6.
22. Vicari G, Bauer SR, Neuner EA, Lam SW. Association between colistin dose and microbiologic outcomes in patients with multidrug-resistant gram-negative bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2013;56(3):398-404.
23. Benattar YD, Omar M, Zusman O, Yahav D, Zak-Doron Y, Altunin S, et al. The Effectiveness and Safety of High-Dose Colistin: Prospective Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 2016;63(12):1605-12.
24. Dudhani RV, Nation RL, Li J. Evaluating the stability of colistin and colistin methanesulphonate in human plasma under different conditions of storage. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(7):1412-5.

B16

Metformin Increases MRP2 Activity in MCF-7 Breast Cancer Cells after Prolonged Treatment

Ploy Wannapakorn, Suree Jianmongkol

Departments of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Abstract

Metformin is a biguanide anti-diabetic drug with various pharmacological activities including anti-carcinogenic action. This study was to determine the effects of metformin on MRP2 activity in MCF-7 cells. The activity of MRP2 was assessed by measuring intracellular accumulation of CDCF fluorochrome. The results showed that metformin had no direct effect on CDCF accumulation after 30-min treatment. However, prolong exposure of MCF-7 cells with 5 mM metformin for 48 hr resulted in increased MRP2 activity. These data suggested that metformin might be able to increased MRP2 function in the breast cancer cells possibly via up-regulation of MRP2 protein expression. Further studies on its mechanism and an involvement of AMPK activation should be pursued

Keywords: Metformin, MRP2, MCF-7 cells

เมทฟอร์มินเพิ่มการทำงานของเอ็มอาร์พีทูในเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟเซเวนหลังจาก ที่ให้เป็นระยะเวลานาน

พลอย วรรณภากร, สุรีย์ เจียรณมงคล

ภาคเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

เมทฟอร์มินเป็นยารักษาเบาหวานในกลุ่มไบควาไนด์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย รวมถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเมทฟอร์มินต่อการทำงานของเอ็มอาร์พีทูในเซลล์ MCF-7 โดยวัดการทำงานของเอ็มอาร์พีทูจากการสะสมของสารเรืองแสง CDCF ภายในเซลล์ ผลการทดลองพบว่าเมทฟอร์มินไม่มีผลโดยตรงต่อการสะสมของ CDCF หลังจากให้ให้นาน 30 นาที อย่างไรก็ตามการให้เมทฟอร์มิน 5 mM แก่เซลล์ MCF-7 เป็นระยะเวลานาน 48 ชั่วโมง มีผลเพิ่มระดับการทำงานของเอ็มอาร์พีทู ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเมทฟอร์มินอาจเพิ่มการทำงานของเอ็มอาร์พีทูในเซลล์มะเร็งเต้านมได้ โดยคาดได้ว่าเมทฟอร์มินอาจมีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนเอ็มอาร์พีทู ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกดังกล่าวและความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น AMPK ต่อไป

คำสำคัญ: เมทฟอร์มิน, MRP2, MCF-7 cells

Introduction

Development of multi-drug resistance (MDR) against cytotoxic drugs may cause chemotherapy failure in cancer treatment. This may be due to high expression of drug efflux proteins in the family of ATP binding cassette (ABC) transporters that can actively pump cytotoxic agent out of cancer cells. Therefore, the cytotoxic drugs cannot accumulate within the cells up to their cytotoxic levels, and consequently losing their therapeutic efficacy. These ATP-driven transporters include P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance associated proteins (MRPs) and breast cancer resistant protein (BCRP).¹ The ABC transporters in particular P-gp and MRP2 are intrinsically expressed in several types of cancer cells including breast cancer MCF-7 cells.² In addition, changing in expression levels and functionality of these transporters has been reported in the cells exposed with a number of compounds such as doxorubicin, piperine,³ tamoxifen.² Recently, we demonstrated that MCF-7 cells were induced to express P-gp level after prolonged treatment with doxorubicin. Subsequently, the cells were less sensitive toward doxorubicin treatment.⁴

Metformin (N, N dimethylbiguanide hydrochloride) is a biguanide anti-diabetic drug with various pharmacological activities including anti-tumorigenic effect. Metformin has been reported to inhibit proliferation of various cancer cells such as prostate cancer, colon cancer, ovarian cancer and breast cancer.⁵ Recently it was reported that metformin at the concentrations of 1-10 mM decreased activity of P-gp in MCF-7/adr cells after 2 days treatment.⁶ However, there are no reports on the effect of metformin on MRP2 activity in human breast cancer cells.

This study aimed to investigate the effect of metformin on activity of MRP2 in MCF-7 cells. Its direct inhibitory action as well as its potential to affect MRP2 expression were evaluated. Our findings suggested that metformin might be able to increase MRP2 function after prolong treatment.

Materials and Methods

Cell culture

Human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC® HTB22™). Cells were grown in RPMI-1640 (supplement with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin) in humidified 37 °C, 5% CO₂ and 95% air. Cells were sub-cultured by trypsin-EDTA at 80% confluence.

Cell viability: MTT assay

MCF-7 cells were seeded onto 96 well-plates at the density of 3.1×10^4 cells/cm² and cultured for 2 days. The cells were treated with metformin (1-20 mM) for 24 and 72 hr. At the end of each treatment period, the cells were washed and further incubated with MTT reagent (0.5 mg/ml) for another 4 hours. The formazan

crystals were dissolved with DMSO, and measured the absorbance at 570 nm with a microplate reader (Wallac 1420 VICTOR 3, PerkinElmer Inc., USA). The concentrations of metformin that produced cell death of less than 20% were considered non-cytotoxic.

Expression of ABCC2 mRNA in MCF-7 cells: RT-PCR

The mRNA contents of ABCC2 (MRP2), MDR1 (P-gp), ABCG2 (BCRP1) and beta actin were determined by RT-PCR technique. The cells were lysed and extracted for RNA using TRIzol[®] reagent according to the manufacturer's instructions (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). RNA was reversely transcribed to cDNA by ImProm-II[™] reverse transcription system (Promega, USA), followed by PCR amplification. The PCR conditions for MDR1 were as follows: an initial denaturing at 95°C for 5 minutes, 30 cycles of denaturing at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s; for ABCC2 and beta actin an initial denaturing at 95°C for 5 minutes, 40 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 40 s; and for ABCG2 an initial denaturing at 95°C for 5 minutes, 30 cycles of denaturing at 95°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s and extension at 72°C for 40 s. The following specific primers were used: 5'-CAG ACA GCA GGA AAT GAA GTT GAA-3' and 5'-ACC AAC TCA CAT CCT GTC TGA-3' for MDR1, 5'-ACT TGT GAC ATC GGT AGC ATG C-3' and 5'-GTG GGC GAA CTC GTT TTG-3' for ABCC2, 5'-TGA CAT TAA GGA GAA GCT GTG CTA-3' and 5'-GAG TTG AAG GTA GTT TCG TGG ATG-3' for beta actin and 5'-ATC CCC AGG CCT CTA TAG CT-3' and 5'-GAG ATT GAC CAA CAG ACC ATC A-3' for ABCG2 (The Gemini Singapore Science Park II, Singapore). The PCR products were determined by gel electrophoresis (1.5% agarose) and detected by the reporter dye (SYBR) Green under a luminescence-Image analyzer (ImageQuant[™] LAS 4000, GE Healthcare Bio-sciences, Japan).

Assays of MRP2 activities: Uptake assay

The MRP2 activity was determined by an uptake assay. The cells were seeded onto 24 well-plates at 1.16×10^5 cells/cm², and cultured for 2 days. On the day of experiment, the cells were washed with Hank's balanced salts solution (HBSS) and pre-incubated with metformin (1-5 mM) for 30 min prior to addition of 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDCF-DA, 5 μM) for another 30 minutes. In this study, we used indomethacin (500 μM), a known MRP2 inhibitor as a positive control group. At the end of incubation period, the cells were washed with ice-cold PBS and lysed with 0.1% Triton X-100. The amount of fluorescent CDCF was determined with a microplate reader (Wallac 1420 Perkin-Elmer Victor 3; Perkin Elmer Inc.) at an excitation wavelength 485 nm and emission wavelength 535 nm. The protein was quantified by BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific[™], USA) at 570 nm.

Changing in MRP2 function in the MCF-7 cells after prolonged treatment with metformin was also determined with an uptake assay. In this experiment, the

cells were treated with metformin (up to 5 mM) for 24 and 48 hr. At the end of each treatment period, the cells were washed 3 times prior to measurement of MRP2 activity with the uptake assay as abovementioned. The MRP2 activity was estimated by the % increase in intracellular CDCF in the presence of indomethacin (500 μ M).

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M. of three independent experiments. One-way ANOVA analysis followed by post-hoc Dunnett's test was conducted to indicate the significance of differences at $p < 0.05$.

Results

Cell viability

Metformin could induce cytotoxicity to MCF-7 cells after treatment for 24 and 72 hr in concentration dependent manner. According to our criteria, the apparent cytotoxic concentrations of metformin were greater than 10 mM and 5 mM for 24-hr and 72-hr treatment, respectively (Figure 1).

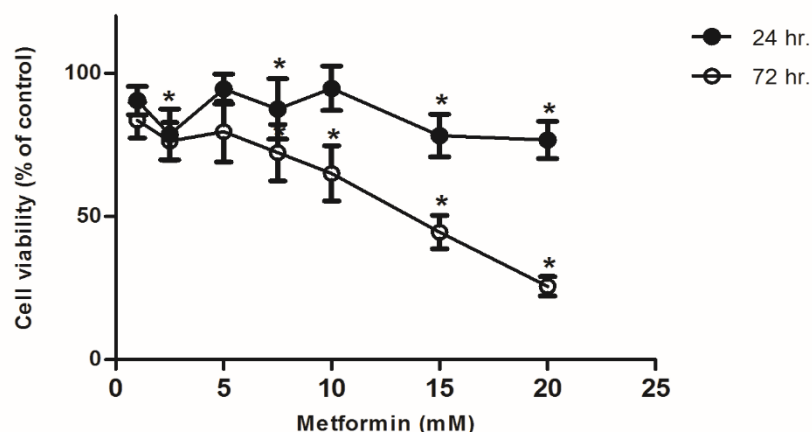


Figure 1. Cell viability after treatment with metformin (1-20 mM) for 24 and 72 hr. * $p < 0.05$ vs control (n = 3 separated experiments).

Expression and activity of MRP2

Expression of ABCC2 mRNA, but not MDR1 mRNA nor ABCG2 mRNA, in our MCF-7 cells was clearly shown in Figure 2. Moreover, the cells exhibited MRP2 activity at appreciable level. The presence of indomethacin (500 μ M) increased intracellular CDCF accumulation by approximately 2.38 fold (Figure 3). Metformin at the concentrations upto 5 mM had no significant effect on intracellular CDCF levels, comparing with the untreated control group (without metformin). Our results suggested that metformin had no inhibitory effect against MRP2 activity.

MRP2 activities of MCF-7 cells after prolonged treatment (24 and 48 hr) with metformin were also assessed. Pretreatment the cells with metformin (upto 5 mM) for 24 hr did not significantly affect intracellular CDCF accumulation, comparing between those in the presence or absence of indomethacin (Figure 4). However, when the metformin treatment period was extended to 48 hr, metformin at the non-cytotoxic concentration of 5 mM was able to increase CDCF accumulation in the presence of indomethacin by approximately 2.22 fold, suggesting an increase of MRP2 function in these cells.

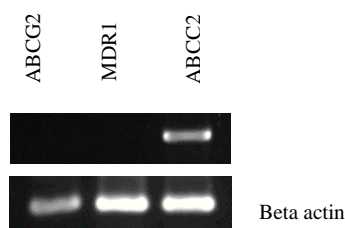


Figure 2. The basal mRNA level of the ABC transporters (ABCG2, MDR1 and ABCC2) in MCF-7 cells.

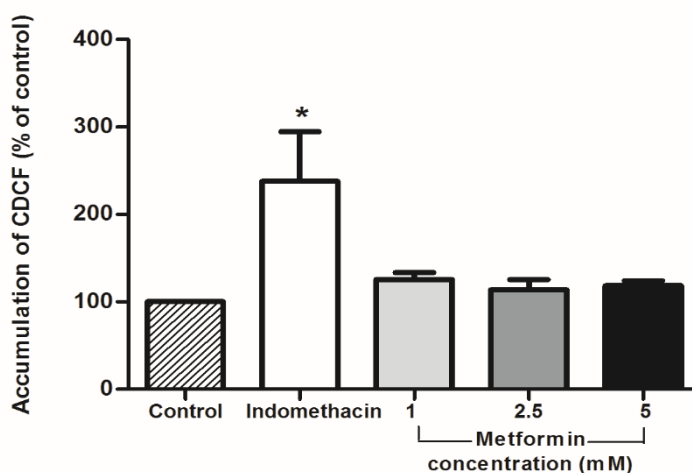


Figure 3. Metformin (upto 5 mM) had no direct inhibitory effect on MRP2 activity after treatment for 30 min. Indomethacin (500 μ M), a known MRP2 inhibitor, was used as a positive control. * $p < 0.05$ vs control ($n = 3$ separated experiments).

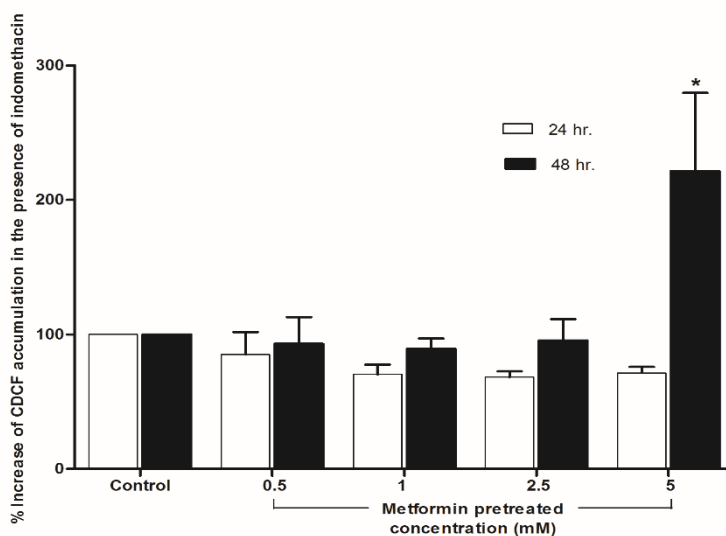


Figure 4. Intracellular accumulation of CDCF. The MCF-7 cells were pretreated with metformin for 24 and 48 hr prior to measurement of MRP2 activity with an uptake assay. Significant increase in intracellular CDCF in the presence of indomethacin (500 μ M) in relative to those in the absence of indomethacin indicated the residual MRP2 activity. * $p < 0.05$ vs control (n = 3 separated experiments).

Discussion

Our studies demonstrated that metformin had no direct effects on MRP2 activity. However, this drug was able to increase MRP2 function after prolonged treatment (48 hr), possibly involving with up-regulation of protein level. However, other previous report of the effect of metformin on P-gp function has showed that metformin (1-10 mM) decreased P-gp activities in MCF-7/adr cells after 2 days treatment.⁶ Although P-gp and MRP2 belong to the ABC transporters, they are encoded by different gene, and possibly with different regulation pathways in transcription and translation processes. Thus, changing in protein expression of each transporter in response to chemical treatment may vary. It was reported that the content of MDR1 mRNA in hepatocytes isolated from lipopolysaccharide-treated rats increased whereas the content of MRP2 mRNA decreased.⁷ It might be anticipated that metformin had different effects on P-gp and MRP2 expression.

The mechanisms of metformin in increasing MRP2 activity are needed further investigation. Further studies on metformin-mediated MRP2 expression at transcription and translation levels should be pursued. Moreover, activation of AMPK has been linked to an increase of Na⁺, K⁺ ATPase activity in skeletal muscle cells.⁸ The inductive effect of metformin, a known AMPK activator, on MRP2 functionality via increasing ATPase activity should be also studied in the future.

Conclusion

Metformin had no direct interference on MRP2 activity. However, this drug was able to increase MRP2 function in MCF-7 cells after prolong treatment (48 hr).

Acknowledgements

We thank Chulalongkorn University Drugs and Health Products Innovation Promotion Center (CUDHIP) for their facilities.

References

1. Leonard GD, Fojo T and Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *The Oncologist* 2003;8:411-424.
2. Choi HK, Yang JW, Roh SH, Han CY and Kang KW. Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen resistant breast cancer cells. *Endocrine Related Cancer* 2007;14:293-303.
3. Li S, Lei Y, Jia Y, Li N, Wink M and Ma Y. Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine* 2011;19:83-87.
4. Chaisit T, Siripong P and Jianmongkol S. Rhinacanthin-C enhances doxorubicin cytotoxicity via inhibiting the functions of P-glycoprotein and MRP2 in breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 2016;795: 50-57.
5. Ben Sahara I, Le Marchand Brustel Y, Tanti JF and Bost F. Metformin in cancer therapy: A new perspective for an old antidiabetic drug. *Molecular Cancer Therapeutics* 2010;9:1092-1099.
6. Kim HG, Hien TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW, et al. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- κ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *British Journal of Pharmacology* 2010;62:1096-1108.
7. Vos TA, Hooivel GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, et al. Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b and down regulation of the organic anion transporter Mrp2 and the bile salt transporter, Spgp in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 1998;6:1637-1644.
8. Benziane B, Björnholm M, Pirkmajer S, Austin RL, Kotova O, Viollet B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase stimulates Na⁺, K⁺-ATPase activity in skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 2012;28: 23451-63.

B17

Role of NOX on Intracellular Reactive Oxygen Species and Platelet Activity in β -Thalassemia/Hemoglobin E

Manuschaya Chobtham¹, Sirada Srihirun², Tipparat Parakaw², Pornpun Vivithanaporn³, Kran Suknuntha³, Kovit Pattanapanyasat⁴, Nathawut Sibmooh³

¹*Toxicology Multidisciplinary Unit, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

²*Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

³*Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

⁴*Center of Excellence for Flow Cytometry, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand.*

Abstract

Platelet hyperactivity is associated with vascular complications in thalassemia. The mechanism of platelet hyperactivity in β -thalassemia/hemoglobin(Hb) E remains unclear. We hypothesized that increased intracellular reactive oxygen species (ROS) generated by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) may be involved in platelet hyperactivity in thalassemia. ROS levels were determined in platelets from healthy and β -thalassemia/HbE subjects (N = 6 each). We measured ROS in platelets by dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. Baseline and thrombin-induced platelets of β -thalassemia/HbE than healthy subjects ROS and P-selectin expression were higher in. Inhibition of NOX by apocynin decreased baseline and thrombin-induced ROS generation and P-selectin expression on platelets of β -thalassemia/HbE subjects. In conclusion, thalassemic platelets have elevated ROS levels generated from NOX, and increased intracellular ROS may play a role in platelet hyperactivity in thalassemia patients.

Keywords: thalassemia, platelet, ROS, NAH(P)H oxidase

บทบาทของ NOX ต่อ reactive oxygen species ภายในเซลล์และการทำงานของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอี

มนัสชยา ขอบธรรม¹, ลีรดา ศรีหิรัญ², ทิพรรัตน์ ปาระแก้ว², พรพรรณ วิจิธนาภรณ์³, กรานต์ สุชนันท์ระ³, โกวิทช์ พัฒนาปัญญาสัตย์⁴, ณัฐรุจ สิบหมุ³

¹สาขาวิชาพิษวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

³ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

⁴คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ภาวะเกล็ดเลือดไวเกี่ยวข้องกับภาวะแทรกซ้อนทางหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย อย่างไรก็ตามกลไกที่ทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดไวในอาสาสมัครธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอียังคงไม่ชัดเจน สมมติฐานของการศึกษานี้ คือมี reactive oxygen species (ROS) มากขึ้นที่ถูกสร้างจากเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) และอาจจะเกี่ยวข้องกับภาวะเกล็ดเลือดไวในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การศึกษานี้ วัดระดับของ ROS ในเกล็ดเลือดของอาสาสมัครคนสุขภาพแข็งแรงและอาสาสมัครธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอี (6 คนต่อกลุ่ม) การวัด ROS ในเกล็ดเลือด โดยวิธีวิเคราะห์ไดคลอโรไดไฮโดรฟลูออเรสซิน (DCFH-DA assay) ระดับ ROS และการแสดงออกของ P-selectin บนเกล็ดเลือดในภาวะพื้นฐานและหลังถูกกระตุ้นด้วย thrombin มีค่าสูงขึ้นในอาสาสมัครธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอีมากกว่าอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรง การยับยั้ง NOX ด้วย apocynin ลดระดับ ROS และการแสดงออกของ P-selectin บนเกล็ดเลือดของอาสาสมัครธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอี ทั้งในภาวะพื้นฐานและหลังถูกกระตุ้นด้วย thrombin บทสรุป เกล็ดเลือดของอาสาสมัครธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอี มีการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS ซึ่งถูกสร้างจาก NOX และ ROS ในเซลล์อาจมีบทบาทต่อการเพิ่มความไวในการตอบสนองของเกล็ดเลือด (hyperactivation)

คำสำคัญ : ธาลัสซีเมีย, เกล็ดเลือด, ROS, NAD(P)H oxidase

Introduction

Platelet hyperactivity is associated with vascular complications such as pulmonary hypertension and thrombosis in thalassemia^{1,2}. The increased reactive oxygen species (ROS), decreased antioxidants, and iron overload may lead to endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in thalassemia^{3,4}. ROS play a role as intracellular signaling molecules during platelet activation induced by thrombin and collagen^{5,6}. Increased intracellular ROS in platelets are related with vascular diseases such as atherosclerosis, hypertension and pulmonary hypertension^{7,8}. Platelets of thalassemia subjects have high ROS and low glutathione (GSH) levels⁹. However, the role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) on ROS levels in thalassemic platelets has not been investigated.

ROS play an important role in regulation of platelet function and promotion of platelet activation. In turn, activated platelets have ability to produce ROS that are able to modify platelet function¹⁰. The ROS in platelets are generated from activated NOX during platelet activation. Superoxide anion and hydrogen peroxide behave as second messengers to induce a series of platelet activating events such as cytosolic calcium elevation, thromboxane A₂ (TXA₂) secretion, and granule release^{11,12}.

In this study, we aimed to investigate the role of NOX on intracellular ROS and platelet activity in thalassemia.

Materials and Methods

Subjects

Six healthy and six β -thalassemia/Hb E subjects were enrolled in this study. Criteria of healthy and thalassemia subjects must be 20-40 years old, did not take anti-platelets drug and blood transfusion at least 2 weeks. For β -thalassemia/Hb E subjects must be splenectomized. The protocol was approved by institutional review board (Ramathibodi hospital, Mahidol University, Thailand) on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects under project No.ID-03-56-27.

Blood sample collection

Four milliliters of venous blood were placed to tubes containing acid citrate dextrose buffer at ratio 6:1 and gently mixed.

Wash platelet preparation

Blood samples were centrifuged at 120 g for 5 minutes at room temperature, and then platelet-rich plasma (PRP) was collected. Prostacyclin (PGI₂) (500 nM) was added into PRP to prevent platelet activation before centrifugation at 500 g for 5 minutes to collect platelet pellet. Platelet pellet was washed with CGS washing buffer

(120 mM NaCl, 12.9 mM tri-Na-citrate, 30 mM D-glucose pH 6.5). After centrifugation, platelets were resuspended in Tyrode's incubation buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.36 mM Na₂HPO₄, 5mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, 0.1% BSA pH 7.4) at ratio 1:2 and further incubated at 37 °C for 1 hour before starting experiments.

Measurement of ROS generation in platelets

Washed platelets were pre-incubated with 10 µM dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) for 15 minutes at 37 °C in dark. The washed platelets (100 µl) were added into tubes containing saturated concentrations of PEcy5-labeled CD42b (a platelet marker) and PE-labeled CD62P (a platelet activation marker), and incubated in dark at room temperature for 15 minutes. Then, the platelets were stimulated with 2 U/ml thrombin and incubated for 15 minutes. In a separate set of experiment, 600 µM apocynin (an NADPH oxidase inhibitor) was pre-incubated for 15 minutes before stimulation with thrombin. Platelets were diluted with Tyrode's buffer containing 10 µM DCFH-DA and analyzed immediately. Intracellular ROS levels and P-selectin expression were measured by BD AccuriTM C6 flow cytometer (BD Biosciences). The baseline levels of ROS and P-selectin (CD62P) expression were quantified in samples without thrombin and used as a reference for subsequent experiments. A percentage of cells with CD62P expression greater than the baseline levels were calculated from 30,000 events positive for CD42b. ROS stimulation indexes were calculated from the mean fluorescence intensity (MFI) expressed as fold change relative to unstimulated platelet set as 10.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Student's *t* test (GraphPad, San Diego, CA). Results are shown as means ± SEM. Statistical significance was considered if *P*-value < 0.05.

Results

Baseline intracellular ROS and P-selectin expression on platelet

The levels of intracellular ROS and P-selectin expression on platelets were higher in β -thalassemia/HbE than healthy subjects ($*P < 0.05$) (Figure 1).

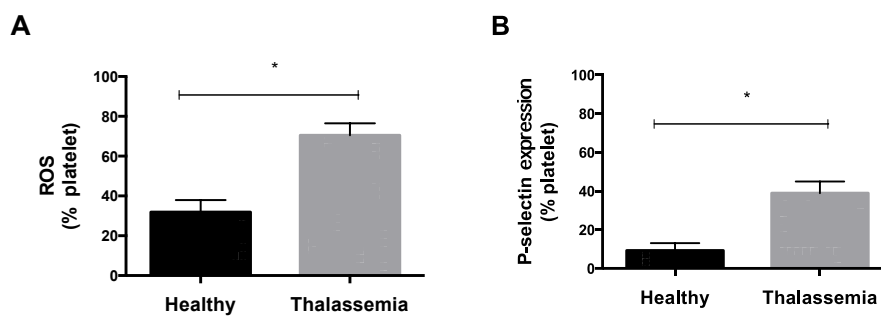


Figure 1 Baseline intracellular ROS (A) and P-selectin expression (B) on platelets of healthy and β -thalassemia/HbE subjects (N = 6 each) $*P < 0.05$ (unpaired *t* test).

Thrombin-induced ROS and P-selectin expression

The levels of intracellular ROS and P-selectin expression induced by thrombin (2 units/ml) were higher in platelets from thalassemia subjects than those from healthy subjects (Figure 2).

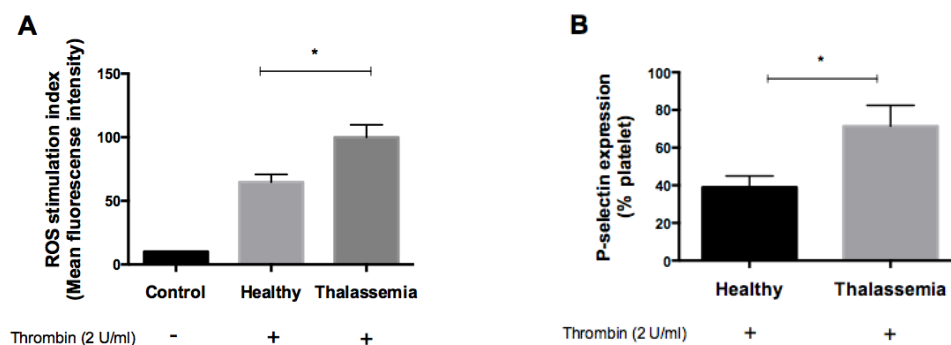


Figure 2 Thrombin-induced intracellular ROS generation (A) and P-selectin expression (B) on platelets from healthy and β -thalassemia/HbE subjects (N = 6 each). $*P < 0.05$ (unpaired *t* test).

Effect of NOX inhibitor on ROS and P-selectin expression

Apocynin, a NOX inhibitor, decreased intracellular ROS and P-selectin expression on healthy and thalassemic platelets (Figure 3,4).

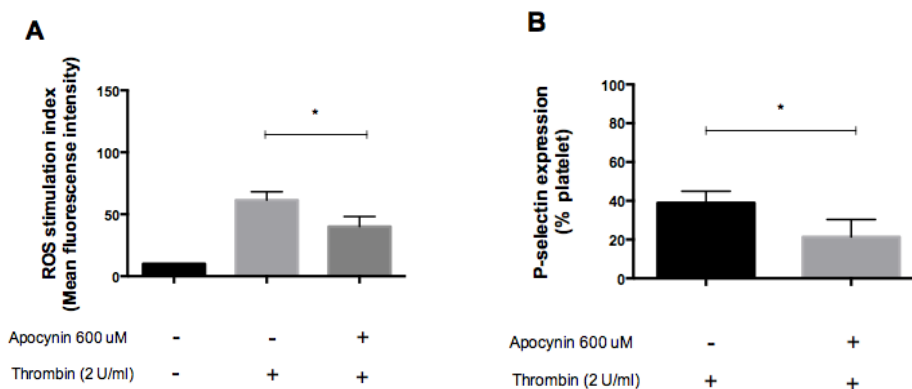


Figure 3 Apocynin inhibited intracellular ROS generation (A) and P-selectin expression (B) induced by thrombin on platelets from healthy subjects (N = 6 each). * $P < 0.05$ (unpaired t test).

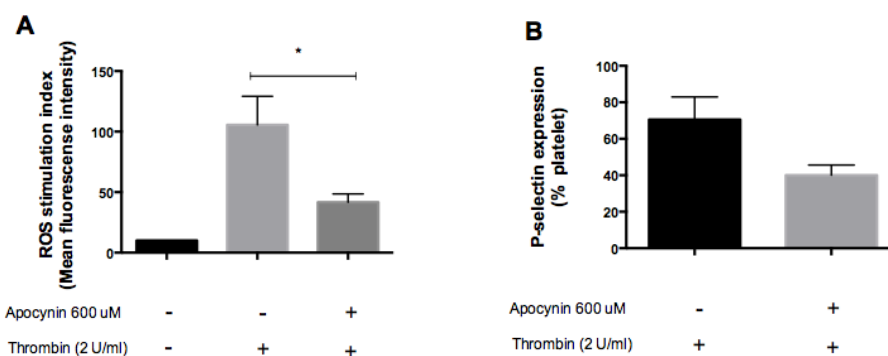


Figure 4 Apocynin inhibited intracellular ROS generation (A) and P-selectin expression (B) induced by thrombin on platelets from β -thalassemia/HbE (N = 6 each). * $P < 0.05$ (unpaired t test).

Discussion

We demonstrate higher levels of ROS and P-selectin expression on platelets of β -thalassemia/HbE subjects compared with healthy subjects. Both baseline and

thrombin-induced ROS generation and P-selectin expression are higher in thalassemia than healthy subjects. P-selectin expression induced by thrombin is related with ROS generated by NOX, because a NOX inhibitor (apocynin) can inhibit ROS generation and P-selectin expression.

P-selectin is platelet degranulation marker. P-selectin is released from platelet α -granules and then incorporated into membrane. The expression of P-selectin on platelets is elevated in splenectomized β -thalassemia/HbE subjects in comparison with non-splenectomized thalassemia and healthy subjects. Only splenectomized subjects were enrolled in our study. Splenectomized thalassemia subjects also have increased soluble P-selectin in plasma. Here, we provide additional data that the baseline and agonists-induced P-selectin expression increase in splenectomized thalassemia subjects¹.

Thalassemic platelets has decreased glutathione and increased ROS⁹. ROS such as superoxide and hydrogen peroxide play role as signaling molecules during platelet activation, in particular when induced by collagen and thrombin^{11,12}. It is unknown whether increase in baseline intracellular ROS is due to oxidative stress or platelet hyperactivity. Nonetheless, antioxidants such as vitamin E and reduced glutathione can decrease platelet activity in thalassemia^{13,14}. Apart from oxidative stress, platelet hyperactivity may result from decreased nitric oxide and prostacyclin secondary to endothelial dysfunction^{15,16}.

NOX is a primary enzyme responsible for ROS generation in platelets. Collagen and thrombin are strong platelet agonists known to mediate platelet activation through NOX activation and subsequent ROS generation¹⁷. ROS can activate kinase proteins such as ERK, AKT and P38 leading to thromboxane A₂ synthesis, integrin α IIb β 3 activation, P-selectin expression, and degranulation^{18,19}. NOX inhibitors can inhibit platelet ROS production, platelet activation, and prevention of thrombosis in human. Thereby, NOX inhibition may be a new strategy for therapy of platelet hyperactivity in thalassemia.

Conclusion

In summary, these studies indicate that intracellular ROS expression in healthy and thalassemia platelets were generated from NAD(P)H oxidase. These ROS may play a role in promoting platelet activation in β -thalassemia/HbE patients.

Acknowledgements

We thank Miss Thanaporn Sriwantana, Miss Jirada Kaewchuchuen, Mister Krit Rattanawonsakul for laboratory support. This project was supported by funds from department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University.

References

1. Srihirun S, Tanjararak N, Chuncharunee S, Sritara P, Kaewvichit R, Fucharoen S, et al. Platelet hyperactivity in thalassemia patients with elevated tricuspid regurgitant velocity and the association with hemolysis. *Thrombosis Research*. 2015;135(1):121-6.
2. Atichartakarn V, Angchaisuksiri P, Aryurachai K, Chuncharunee S, Thakkestian A. In vivo platelet activation and hyperaggregation in hemoglobin E/beta-thalassemia: a consequence of splenectomy. *International Journal of Hematology*. 2003;77: 299-303.
3. Pasin M, Yavuzer S, Tekin M, Akar N, Violi F. Oxygen free radical-dependent increased platelet function in beta-thalassemia major patients. *Thrombosis Research*. 1998;92: 283-6.
4. Singer ST, Kuypers FA, Styles L, Vichinsky EP, Foote D, Rosenfeld H. Pulmonary hypertension in thalassemia: association with platelet activation and hypercoagulable state. *American Journal of Hematology*. 2006;81(9):670-5.
5. Carrim N, Arthur JF, Hamilton JR, Gardiner EE, Andrews RK, Moran N, et al. Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: A novel role for protease-activated receptor 4 and GPIIb/IIIa. *Redox Biology*. 2015;6:640-7.
6. Jang JY, Min JH, Chae YH, Baek JY, Wang SB, Park SJ, et al. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via SHP-2 oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(16):2528-40.
7. Violi F, Pignatelli P. Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thrombosis research*. 2012;129(3):378-81.
8. Wong CM, Bansal G, Pavlickova L, Marcocci L, Suzuki YJ. Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18(14):1789-96.
9. Amer J, Fibach E. Oxidative status of platelets in normal and thalassemia blood. *Thrombosis and Hemostasis*. 2004;92(5):1052-9.
10. Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24(11):1988-96.
11. Handin RI, Karabin R, Boxer GJ. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *The Journal of Clinical Investigation*. 1977;59(5):959-65.
12. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood*. 1998;91(2):484-90.
13. Unchern S, Laoharuangpanya N, Phumala N, Sipankapracha P, Pootrakul P, Fucharoen S, et al. The effects of vitamin E on platelet activity in beta-thalassaemia patients. *British Journal of Haematology*. 2003;123(4):738-44.

14. Kalpravidh RW, Tangjaidee T, Hatairaktham S, Charoensakdi R, Panichkul N, Siritanaratkul N, et al. Glutathione redox system in beta -thalassemia/Hb E patients. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:543973.
15. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. 2001;85(3):342-50.
16. Smith JB. Prostaglandins and platelet aggregation. *Acta Medica Scandinavica Supplementum*. 1981;651:91-9.
17. Violi F, Pignatelli P. Platelet NOX, a novel target for anti-thrombotic treatment. *Thrombosis and Haemostasis*. 2014;111(5):817-23.
18. Chlopicki S, Olszanecki R, Janiszewski M, Laurindo FR, Panz T, Miedzobrodzki J. Functional role of NADPH oxidase in activation of platelets. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2004;6(4):691-8.
19. Walsh TG, Berndt MC, Carrim N, Cowman J, Kenny D, Metharom P. The role of Nox1 and Nox2 in GPVI-dependent platelet activation and thrombus formation. *Redox Biology*. 2014;2:178-86.

B18**Nitric Oxide (NO) Metabolites and Expression of Genes Associated with NO production in Breast Cancer Tissues from Patients****Peerawich Kongkaew¹, Ronnarat Suvikapakornkul², Pornpun Vivithanaporn¹, Nathawut Sibmooh¹**¹*Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand*²*Department of Surgery, Faculty of Medicine, Ramathibodi hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand***Abstract**

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide including Thailand. Previous studies reported that nitric oxide (NO) at nanomolar concentrations promotes proliferation of cancer cells in the microenvironment with limited oxygen and nutrients. The aim of this study was to determine the NO level and expression of genes associated with NO production in breast tissues obtained from patients diagnosed with breast cancer. The results showed that nitrite and nitrate levels were higher in breast cancer tissues than normal adjacent breast tissues. The mRNA expressions of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and xanthine oxidoreductase (XOR) were not different between breast cancer tissues and normal adjacent tissues. In conclusion, increases in NO metabolites were observed in breast cancer tissue whereas there was no change in mRNA expressions of gene for NO production. Increased nitrite and nitrate levels in breast cancer tissues suggest that NO can promote cancer cell proliferation. Thus, inhibition of NO synthesis could be a novel therapeutic approach. Further study is required to correlate NO levels with clinical variables, and to elucidate the mechanism of increased NO.

Keywords: Breast cancer, nitric oxide

การเพิ่มขึ้นของระดับเมแทบอลิท์ของไนตริกออกไซด์ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมจากผู้ป่วย

พีริชัญญ์ คงแก้ว¹, รณรัฐ สุวิริยะปกรณ์กุล², พรพรรณ วิวิธนาภรณ์¹, ณัฐวรุณ ลิขหภูมิ¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

²ภาควิชาคัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยในผู้หญิงทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทยความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ในระดับที่ต่ำส่งเสริมการเจริญแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในสภาวะที่มีออกซิเจนและสารอาหารจำกัด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับของไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับไนตริกออกไซด์ในเนื้อเยื่อเต้านมจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเต้านมผลการศึกษาพบว่า ระดับไนไตรท์และไนเตรตในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติที่อยู่ข้างเคียงเนื้อเยื่อมะเร็ง แต่ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไนตริกออกไซด์ คือ เอนโดทีเลียม-ไนตริกออกไซด์ซินเทส (eNOS), อินดิวิชเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (iNOS) และแซนทีน-ออกซิดรีดักเทส (XOR) ระหว่างเนื้อเยื่อดังกล่าว โดยสรุป ระดับเมแทบอลิท์ของไนตริกออกไซด์ เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม แต่ระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไนตริกออกไซด์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง การเพิ่มขึ้นของไนไตรท์และไนเตรตในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม สรุปว่าไนตริกออกไซด์สามารถสนับสนุนการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์อาจจะเป็นแนวทางการรักษาใหม่ ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับไนตริกออกไซด์และตัวแปรทางคลินิกอื่นๆของผู้ป่วยและเพื่อศึกษาการเพิ่มขึ้นของระดับไนตริกออกไซด์

คำสำคัญ: มะเร็งเต้านม, ไนตริกออกไซด์

Introduction

Breast cancer is one of the most common cancers in women, leading to high morbidity and mortality. NO is known as a vasodilator and platelet inhibitor. Correlation between NO and cancer cell growth was reported^{1, 2}. However, high NO concentrations inhibits cancer cell growth³⁻⁵. Effect of NO on cancer cells is therefore dependent on its concentration⁶. The high NO levels can be achieved by increasing eNOS or iNOS expression in cancer cells⁷. NO at 1 – 100 nM can promote angiogenesis, stimulate cancer cell proliferation, and inhibit apoptosis. In contrast, NO at concentration higher than 300 nM can induce apoptosis of cancer cells⁸. NO is oxidized to nitrite (NO₂) by autoxidation or oxidants. Nitrite can be further oxidized to nitrate (NO₃) by hemoglobin or heme-containing proteins such as myoglobin, cytoglobin and neuroglobin. Nitrate can be converted to nitrite by bacteria in oral cavity and colon. Nitrite is converted to NO by deoxyhemoglobin, xanthine oxidoreductase (XOR)^{9, 10}, or mitochondrial enzyme¹¹.

In this study, we aimed to evaluate NO metabolite levels and mRNA expression of genes associated with NO production in breast cancer tissues from patients.

Materials and Methods

Tissues collection from patients

Human breast tissues were obtained from Department of Surgery, Ramathibodi hospital, Mahidol University, Thailand. Breast tissues were collected from operation room and stored at -80 °C until use (N=24). The project was approved by Committee on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University based on the declaration of Helsinki, protocol ID 03-58-32. Nitrite and nitrate were measured by tri-iodide based and vanadium chloride based chemiluminescence methods, respectively. The expressions of mRNA NOS and XOR enzymes were determined by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

Measurement of nitrite and nitrate in breast tissues

Frozen tissues were thawed on ice and weighted. Tissues were homogenized with 1.5 mL of homogenized solution containing with stabilizers (1 mM of KCN, 12 mM of K₃Fe₂(CN)₆, 10 mM of NEM and DTPA). Afterwards, homogenized tissue was injected into column containing tri-iodide solution for nitrite determination and vanadium chloride for nitrate determination¹²⁻¹⁴. The signals were recorded and area under the curve (AUC) was determined using Origin 7 (Origin lab, Northampton, MA, USA).

Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

Breast tissue was homogenized with lysis buffer (Jena Bioscience, Jena, Germany) containing 2-mercaptoethanol. After that, 1000 μ l of homogenized sample was mixed with 600 μ l of isopropyl alcohol to precipitate RNA. The mixture was transferred to extraction column (Jena Bioscience, Jena, Germany). The RNA concentration was determined by Nanodrop spectrophotometer. The complementary DNA (cDNA) was generated by 1 μ g of total RNA, random primers (Roche, Basel, Switzerland), and superscript III transcriptase (Invitrogen) at 50 °C. The quantification was monitored by measuring the increasing of fluorescence intensity using iTaqTM Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on Applied Biosystems real time PCR 7500 machine. The quantitative gene expression data was normalized to mRNA level of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH).

Statistical analysis

Data were presented as means \pm SEM or medians with interquartile range (IQR). *p* value less than 0.05 was considered statistically significant difference (GraphPad, San Diego, CA).

Results

Levels of NO metabolites (nitrite and nitrate) in breast tissues

Nitrite and nitrate levels are reported as nanomole per gram of breast tissues. The results showed that breast cancer tissues had significant higher nitrite and nitrate levels than normal adjacent tissues [median (IQR) for nitrite: 17.99 (0.8945-28.82) vs. 14.47 (0.9368-26.61); for nitrate: 401.4 (163.7-617.1) vs. 276.3 (179.2-414.5)] (Figure 1).

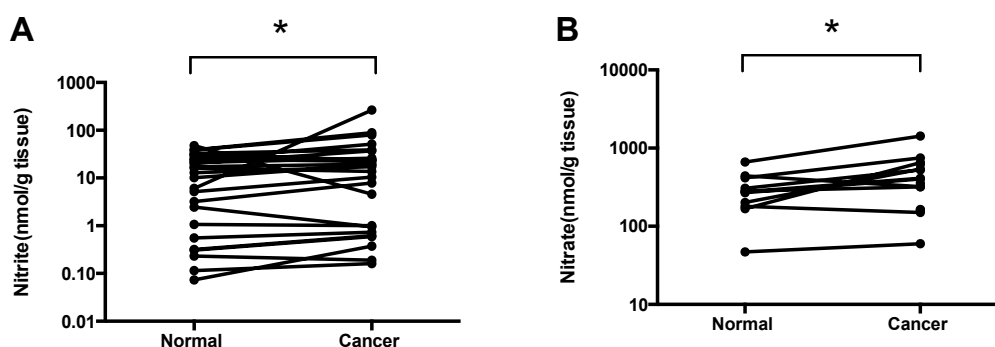


Figure 1. The nitrite (A) (N = 26) and nitrate (B) (N = 12) levels in normal adjacent tissues and breast cancer tissues from patients. **p* < 0.05, Wilcoxon signed rank test.

mRNA expression of genes associated with NO synthesis in breast tissues

The mRNA expressions of eNOS, iNOS and XOR were analyzed in normal adjacent and cancer tissues by real-time PCR. There was no difference in eNOS, iNOS, and XOR mRNA levels between normal and cancer breast tissues (Figure 2A-C).

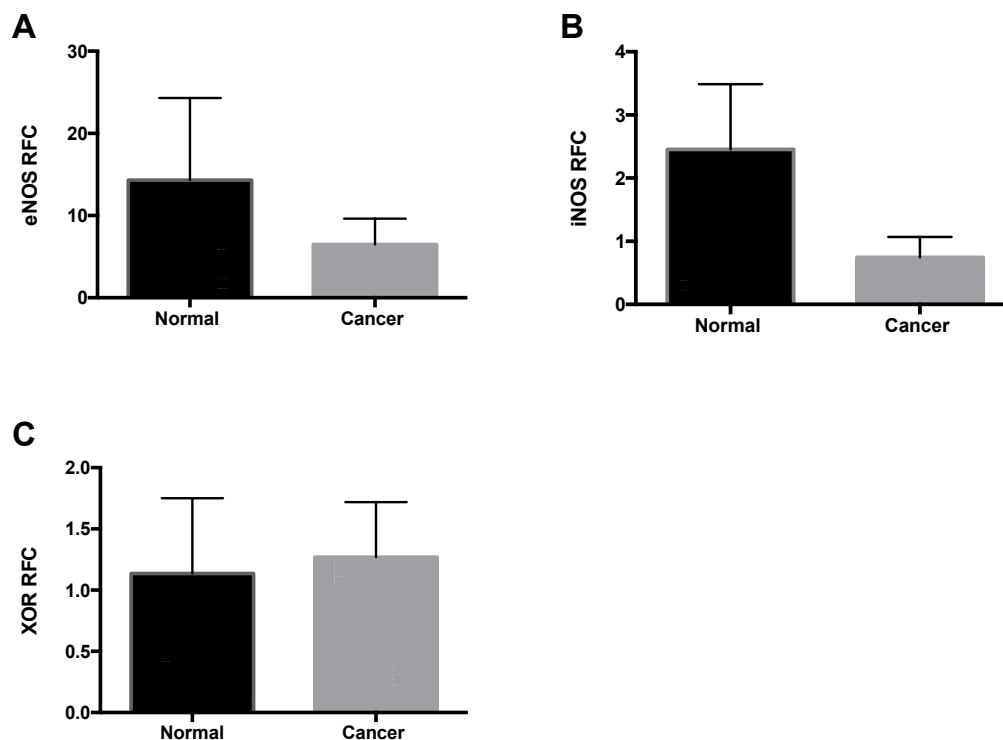


Figure 2. mRNA of eNOS (A), iNOS (B), and XOR (C) in breast cancer tissues from patients (N = 3-13). Data are means \pm SEM, Mann Whitney *U* test.

Discussion

In this study, we demonstrated that the nitrite and nitrate levels were higher in breast cancer tissues than normal adjacent tissues. However, there was no change in mRNA expression of genes involving in NO production, *i.e.*, eNOS, iNOS, and XOR. The nitrite concentration in range of 10 – 20 nM in breast tissues is known to be able to promote cancer cell growth⁸. The nitrate levels are also higher in breast cancer tissues than normal tissues. The mRNA expression of eNOS and iNOS are not different between normal and cancer breast tissues; however, more number of samples is needed to confirm this pilot result. Our results are inconsistent with earlier reports that eNOS and iNOS expression are increased in breast cancer cells, as shown by immunohistochemistry⁷. Although the mRNA levels of enzymes are not different, it is possible that the enzyme activity or amount may increase. Therefore, the activity

and amount of eNOS and iNOS requires further investigation by western blot analysis.

Conclusion

NO metabolites (nitrite and nitrate) are increased in breast cancer tissues than normal adjacent tissues, but the mRNA expressions of eNOS, iNOS, and XOR are not changed.

Acknowledgements

We thank Miss Nannaphat Phiewphong for laboratory support. This project was supported by funds from department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University and the Thailand research fund grant number IRG5780011.

References

1. Xu, W., et al., The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res*, 2002. **12**(5-6): p. 311-20.
2. Lala, P.K. and A. Orucevic, Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. **17**(1): p. 91-106.
3. Korde Choudhari, S., et al., Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*, 2013. **11**(1): p. 1-11.
4. Cheng, H., et al., Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Lett*, 2014. **353**(1): p. 1-7.
5. Le, X., et al., Nitric oxide synthase II suppresses the growth and metastasis of human cancer regardless of its up-regulation of protumor factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(24): p. 8758-63.
6. Burke, A.J., et al., The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(3): p. 503-12.
7. Loibl, S., et al., Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Cancer*, 2002. **95**(6): p. 1191-8.
8. Ridnour, L.A., et al., Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide*, 2008. **19**(2): p. 73-76.
9. van Faassen, E.E., et al., Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev*, 2009. **29**(5): p. 683-741.

10. Godber, B.L., et al., Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem*, 2000. **275**(11): p. 7757-63.
11. Wu, T., et al., Plasma levels of nitrate and risk of prostate cancer: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(7): p. 1210-8.
12. Basu, S., et al., Chemiluminescent detection of S-nitrosated proteins: comparison of tri-iodide, copper/CO/cysteine, and modified copper/cysteine methods. *Methods Enzymol*, 2008. **440**: p. 137-56.
13. Pelletier, M.M., et al., The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(4): p. 541-8.
14. Yang, B.K., et al., Methodologies for the sensitive and specific measurement of S-nitrosothiols, iron-nitrosyls, and nitrite in biological samples. *Free Radic Res*, 2003. **37**(1): p. 1-10.

B19

Effect of Pomelo on *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* Expressions in Rats

Kritsakorn Rayasilp¹, Supeecha Wittayalertpanya², Piyanuch Wonganan²

¹Inter-department of pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

The expression and function of drug transporters including P-glycoprotein (P-gp), an efflux transporter which is encoded by *Mdr1a* and *Mdr1b* genes in rat and organic anion transporting polypeptide (OATP1B1), an influx transporter which is encoded by *Slc21a5* gene in rat have been shown to be affected by grapefruit. Pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) is a citrus fruit which has been used as food or herbal medicine, known as antioxidant and antihyperlipidemic effects. This study aimed to investigate the effects of pomelo on *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* expressions in rat livers and intestines. Rats were divided into two groups: control group and pomelo group. In pomelo group, they were orally administered pomelo juice (2 ml/kg, *po*) twice daily for 7 days. The expression of hepatic and intestinal *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* mRNA were measured using the real-time reverse transcription polymerase chain reaction. The results of this study clearly illustrated that administration of pomelo juice dramatically down-regulated the expression of hepatic *Slc21a5* mRNA ($p < 0.05$), it however did not alter the expression of *Mdr1a* and *Mdr1b* mRNA in the livers. Conversely, real-time RT-PCR analysis revealed that the levels of *Mdr1a* and *Mdr1b* mRNA in the intestine of rats receiving pomelo juice were significantly lower than those of the control group. The mRNA levels of *Mdr1a* and *Mdr1b* were decreased by 86.47% ($p < 0.001$) and 51.43% ($p < 0.05$) of control whereas intestinal *Slc21a5* mRNA expression remained unchanged. In conclusion, pomelo juice down-regulated the expression of hepatic *Slc21a5* and intestinal *Mdr1a* and *Mdr1b* mRNAs in rats, suggesting that there is a risk of pomelo and drug interaction which is associated with inhibition of drug transporters caused by pomelo.

Keywords: Pomelo, P-glycoprotein (P-gp), organic anion transporting polypeptide (OATP)

ผลของส้มโอต่อการแสดงออกของยีน *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในหนูแรท

กฤษฎกรณ์ ระย้าศิลป์¹, รศ.สุพิชา วิทย์เลิศปัญญา², อ.ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์²

¹สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

P-glycoprotein (P-gp) ซึ่งเป็น efflux transporter ที่ถูกสร้างมาจากยีน *Mdr1a* และ ยีน *Mdr1b* ในหนูแรท และ organic anion transporting polypeptide1B1 (OATP1B1) ซึ่งเป็น influx transporter ที่ถูกสร้างมาจากยีน *Slc21a5* ในหนูแรท ส้มโอเป็นผลไม้ประเภท citrus นำมาใช้เป็นอาหาร และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และลดไขมันในเลือด งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลส้มโอต่อการแสดงออกของยีน *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้หนูแรท โดยแบ่งหนูแรท ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว มีกลุ่มควบคุม (N=3) และกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ (N=3) โดยกลุ่มที่ได้รับส้มโอจะได้รับส้มโอปริมาณ 2 ml/kg วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *Mdr1a* ยีน *Mdr1b* และยีน *Slc21a5* ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรทด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลการทดลองในเซลล์ตับของหนูแรทพบว่าการแสดงออกของยีน *Slc21a5* ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่การแสดงออกของยีน *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในตับของหนูแรทที่ได้รับส้มโอไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ในการศึกษาการแสดงออกในเซลล์ลำไส้เล็กพบว่าการแสดงออกของยีน *Mdr1a* ($p < 0.001$) และ ยีน *Mdr1b* ($p < 0.05$) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีการแสดงออกที่ลดลงถึง 86.57% และ 51.43% ตามลำดับ ขณะที่การแสดงออกของยีน *Slc21a5* ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยสรุปน้ำส้มโอลดการแสดงออกของ *Slc21a5* mRNA ในตับและลดการแสดงออกของ *Mdr1a* และ *Mdr1b* mRNA ในลำไส้ของหนูแรท ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นความเสี่ยงของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างส้มโอกับยาอันเป็นผลเนื่องจากผลการยับยั้งการแสดงออกของ drug transporters ของส้มโอ

คำสำคัญ: ส้มโอ, พีไกลโคโปรตีน, ออร์แกนิก แอนไอออน พอลิเปปไทด์

Introduction

Drug transporters play important roles in the absorption, distribution, and removal of drugs. P-glycoprotein (P-gp), an efflux transporter, is located on various cell types such as hepatocytes and enterocytes. P-gp is encoded by MDR1 gene in human¹ and *Mdr1a* and *Mdr1b* genes in rats². In addition to efflux transporters, uptake transporters of the organic anion transporting polypeptide (OATPs) family, especially OATP1B1, which is encoded by human SLCO1B1 gene³ and rat *Slc21a5* gene², has been shown to be a major determinant of pharmacokinetic profile of many clinical drugs⁴. Since both P-gp and OATP have broad substrate specificity, there is a significant risk for drug-drug interactions through induction and inhibition of these transporters⁵.

Pomelo is a citrus fruit (*Citrus grandis* L. Osbeck), which is originated in Asia; however, the consumption of pomelo is not limited to Asia region but it is spread worldwide⁶. Pomelo is known as good sources of vitamin C and flavonoids⁷. Moreover, the beneficial effects of pomelo such as antioxidant and antihyperlipidemic have been reported⁸. Consequently, the possibility of the concomitant consumption of pomelo with conventional drugs in patient is even more. It however should be noted that pomelo is botanically related to grapefruit (*Citrus paradisi*) and also contains furanocoumarins which has been reported as inhibitors of both CYP3A4 and P-gp⁹. Therefore, this study investigated the effect of pomelo on expressions of drug transporters including, *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* in a rat model. Thus, the study will provide supplemental safety information of herbal-drug interaction.

Materials and Methods

Animal Model

Male Sprague-Dawleys rats with age of 7 weeks and weight of 250 to 300 g (were purchased from supplied by the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Nakorn Pathom, Thailand). All animals were housed as 3 animals/cage and kept in a controlled environment with a 12:12hours light-dark cycle at 25±2°C at the laboratory animal facilities of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University's animal laboratory facilities. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee for animal study of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

Rats were divided into two groups; control and pomelo groups. Animals in the pomelo group were orally administered with pomelo juice (2 ml/kg, *po*) twice daily (9.00 and 17.00) for 7 days. After that, rats were sacrificed under isoflurane anesthesia and livers and intestines were taken and frozen in liquid nitrogen. The mRNA expression levels of hepatic and intestinal drug transporters including *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* were measured.

RNA Isolation and Real time RT-PCR Analysis

Intestinal and hepatic tissues were rinsed with cold 0.9% normal saline. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Then, total RNA was converted to cDNA by ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). Gene amplification was carried out using TaqMan gene expression assays from Applied Biosystems (Carlsbad, CA) with the specific primers as shown in Table 1. The mRNA levels of interested genes in rats receiving pomelo are normalized to GAPDH were expressed in relative to those in control rat using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Table 1. Sequences of primers used for quantitative real-time RT-PCR

gene	orientation	Primer sequences 5' to 3' orientation
<i>Mdr1a</i>	Forward	5'-TCT GGC GGC CAT TAT CCA T-3'
	Reverse	5'-TCA TAC TAC GGT TGT TTC CTA CAT TTG-3'
<i>Mdr1b</i>	Forward	5'-TGA ATC CCA AAG TGA CAC TGG T-3'
	Reverse	5'-ATA CTT CTG CGA ATT GAT CTC CTT ATT-3'
<i>Slc21a5</i>	Forward	5'-CCA CTG CTG AGG TAG TCT TCC TTA TG-3'
	Reverse	5'-CAG AGC CAG AAT GCT AAG TGT GC-3'
GAPDH	Forward	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'
	Reverse	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

Data analysis

The data are presented as mean \pm SEM. Estimation of differences between groups were used an unpaired Student's *t* test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ were determined as statistically significance.

Results**mRNA Expression of hepatic Drug Transporters in Rats**

As shown in Figure 1, oral administration of pomelo juice for 7 days decreased expression of *Slc21a5* mRNA in the liver by approximately 70% ($p < 0.05$), with respect to the control group. Conversely, there were no significant difference in *Mdr1a* and *Mdr1b* mRNA expression between the control group and the pomelo group.

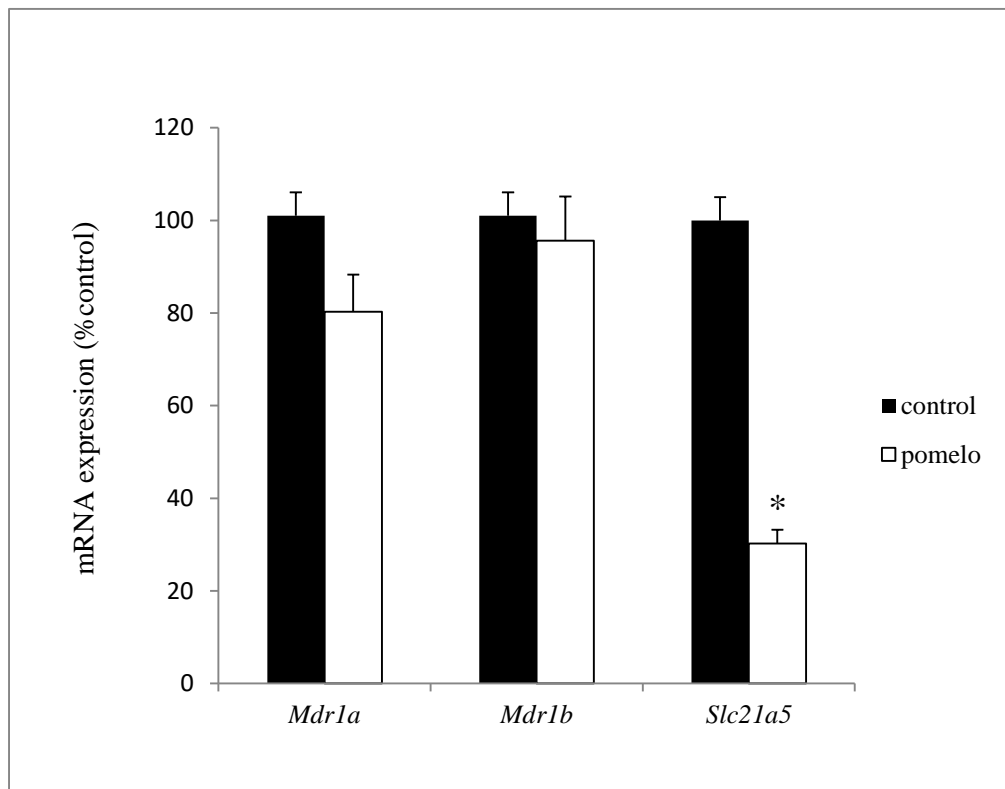


Figure 1. The expression of *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* mRNAs in the livers of control and pomelo rats using quantitative real-time RTPCR (qRT-PCR). Data are presented as mean \pm S.E.M. of three animals in each group. * $p < 0.05$ compared with control rats.

mRNA Expression of intestinal Drug Transporters in Rats

In contrast to the liver, we found that oral administration of pomelo juice down-regulated the expression of *Mdr1a* mRNA in the rat intestine by approximately 85% ($p < 0.001$). Furthermore, a significant reduction in intestinal *Mdr1b* was detected in pomelo juice-treated animals when compared to the control animals ($p < 0.05$). It however should be noted that the expression of the uptake transporter, *Slc21a5* mRNA remained unchanged.

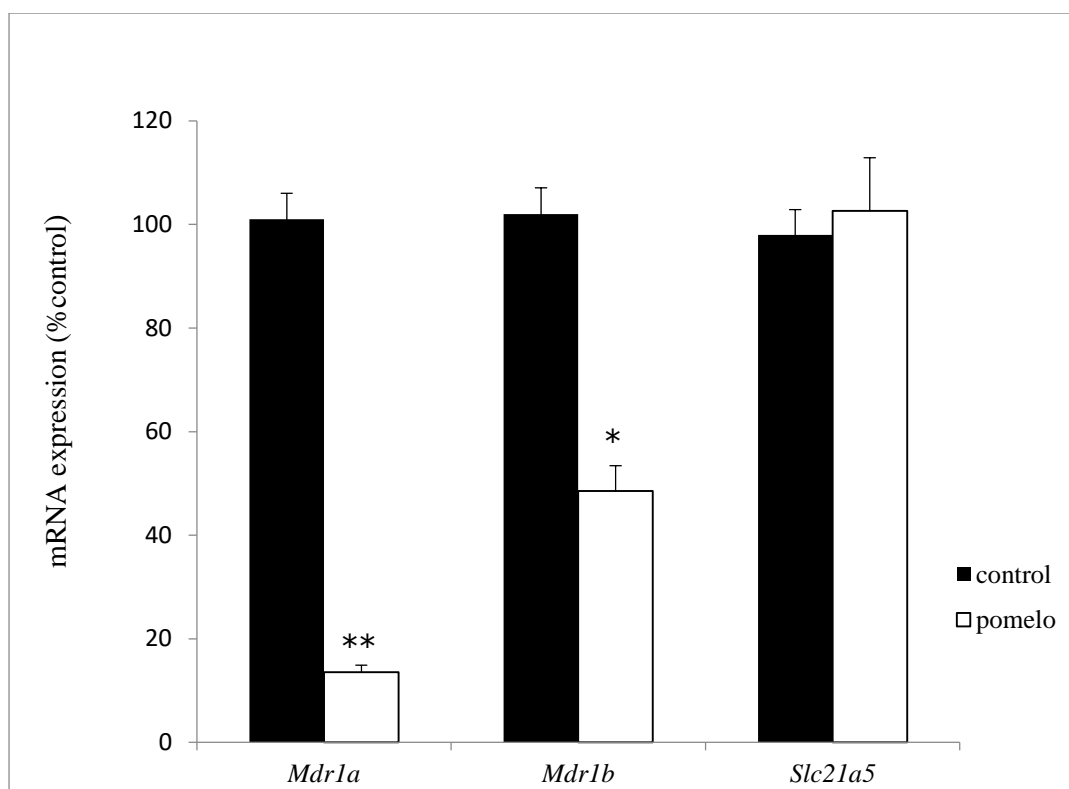


Figure 2. The expression of *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* in the intestines of control and pomelo rats using quantitative real-time RTPCR (qRT-PCR). Data are presented as mean \pm S.E.M. of three animals in each group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ compared with control rats.

Discussion

Previous studies reported that administration of grapefruit resulted in inhibition of enteric P-gp, increasing drug bioavailability or eventually causing toxicity¹⁰. It was shown that grapefruit down-regulated the expression of both P-gp protein and mRNA in HK-2 cell line¹¹. Conversely, Edwards and co-workers (Edwards et al, 1999) demonstrated that consumption of grapefruit for 6 days did not affect the expression of intestinal P-gp protein¹². This study showed that the mRNA expression of *Mdr1a* and *Mdr1b* in the intestine of rats receiving pomelo for 7 days statistically decreased when compared with the control. In addition to efflux transporters, previous studies showed that the component of grapefruit juice such as bergamottin and 6',7'-dihydroxybergamottin could inhibit the activity of drug uptake transporters¹³. It was reported that similar to grapefruit, pomelo has flavonoids which are associated to OATP inhibition¹⁴. The results from this study illustrated that hepatic mRNA expression of *Slc21a5* in the pomelo-treated rats was significantly lower than that in the control animals. The previous study has been reported that

pomelo juices statistically significant enhanced tacrolimus blood concentrations in rat model. They proposed that pomelo may change activity and function of CYP3A and P-gp¹⁵. Consistent with human subjects, the study showed pomelo pulps significantly increased cyclosporine bioavailability. They described that pomelo could inhibit intestinal P-gp or CYP3A in human¹⁶. In more detail, our study demonstrated that pomelo inhibited expression of intestinal drug efflux transporters and hepatic drug uptake transporters which can cause a risk of side effects when concomitant with drugs that are substrates of P-gp and OATPs.

Conclusion

The present study revealed that oral administration of pomelo juice resulted in down-regulation of hepatic *Slc21a5* mRNA expression and intestinal *Mdr1a* and *Mdr1b* in rats, suggesting the potential interaction of drugs that are substrate for P-gp and OATP1B1.

Acknowledgements

The laboratory facilities were supported by Clinical Pharmacokinetics Research Unit in Renal and Cardiovascular Diseases, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. This study was financial supported by 90th Year Chulalongkorn Scholarship.

References

1. Holtzman CW, Wiggins BS, Spinler SA. Role of P-glycoprotein in statin drug interactions. *Pharmacotherapy*. 2006 Nov;26(11):1601-7. PubMed PMID: 17064205.
2. Takeuchi T, Yoshitomi S, Higuchi T, Ikemoto K, Niwa S, Ebihara T, et al. Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1. *Pharmaceutical research*. 2006 Jul;23(7):1460-72. PubMed PMID: 16779700.
3. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et biophysica acta*. 2003 Jan 10;1609(1):1-18. PubMed PMID: 12507753.
4. Ramsey LB, Johnson SG, Caudle KE, Haidar CE, Voora D, Wilke RA, et al. The clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy: 2014 update. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2014 Oct;96(4):423-8. PubMed PMID: 24918167. Pubmed Central PMCID: 4169720.
5. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD. The role of transporters in drug interactions. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the*

- European Federation for Pharmaceutical Sciences. 2006 Apr;27(5): 501- 17. PubMed PMID: 16364611.
6. Morton JF, Dowling CF. Fruits of warm climates. Miami, FL Winterville, N.C.: J.F. Morton ;Distributed by Creative Resources Systems; 1987. xii, 505 p., 24 p. of plates p.
 7. Berhow MA. Flavonoid accumulation in tissue and cell culture. Studies in Citrus and other plant species. Advances in experimental medicine and biology. 1998;439:67-84. PubMed PMID: 9781296.
 8. Makynen K, Jitsaardkul S, Tachasamran P, Sakai N, Puranachoti S, Nirojsinlapachai N, et al. Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. Food chemistry. 2013 Aug 15;139(1-4):735-43. PubMed PMID: 23561168.
 9. Guo LQ, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2000 Jul;28(7):766-71. PubMed PMID: 10859150.
 10. Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. Pharmacogenetics and genomics. 2006 Dec;16(12):873-9. PubMed PMID: 17108811.
 11. Romiti N, Tramonti G, Donati A, Chieli E. Effects of grapefruit juice on the multidrug transporter P-glycoprotein in the human proximal tubular cell line HK-2. Life sciences. 2004 Dec 03;76(3):293-302. PubMed PMID: 15531381.
 12. Edwards DJ, Fitzsimmons ME, Schuetz EG, Yasuda K, Ducharme MP, Warbasse LH, et al. 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. Clinical pharmacology and therapeutics. 1999 Mar;65(3):237-44. PubMed PMID: 10096255.
 13. Karch AM. The grapefruit challenge: the juice inhibits a crucial enzyme, with possibly fatal consequences. The American journal of nursing. 2004 Dec;104(12):33-5. PubMed PMID: 15621963.
 14. Dolton MJ, Roufogalis BD, McLachlan AJ. Fruit juices as perpetrators of drug interactions: the role of organic anion-transporting polypeptides. Clinical pharmacology and therapeutics. 2012 Nov;92(5): 622- 30. PubMed PMID: 23033114.
 15. Egashira K, Sasaki H, Higuchi S, Ieiri I. Food-drug interaction of tacrolimus with pomelo, ginger, and turmeric juice in rats. Drug metabolism and pharmacokinetics. 2012;27(2):242-7. PubMed PMID: 22123127.
 16. Anlamlert W, Sermsappasuk P, Yokubol D, Jones S. Pomelo enhances cyclosporine bioavailability in healthy male Thai volunteers. Journal of clinical pharmacology. 2015 Apr;55(4):377-83. PubMed PMID: 25408261.

B20

Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts of Plant from Sa-Tri-Lhang-Klod Remedy for Postpartum Infection

Khwanchanok Mokmued¹, Srisopa Ruangnoo^{2,3}, Arunporn Itharat^{2,3}

¹ Student of Master of Sciences Program (Applied Thai Traditional Medicine)
Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, 12120, Thailand

²Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine,
Thammasat University, Klongluang, Pathumthani, 12120, Thailand

³Center of Excellence on Applied Thai Traditional Medicine Research (CEATMR),
Faculty of Medicine, Thammasat University, Klongluang, Pathumthani, 12120,
Thailand

Abstract

A Thai traditional remedy for postpartum care called "Sa-Tri-Lhang-Klod" (STK) is in the lists of The National List of Essential Herbal Medicine (NLEM) of Thailand. It has been used for postpartum care on excrete lochia, blood tonic, uterine involution and improving blood circulation. STK consists of 17 herbs which has no reported on the antimicrobial activity. Therefore, the objectives of this study was to investigate the antimicrobial activity of STK and its plant components to compare their antimicrobial activity. All specimens were macerated with 95% ethanol to obtained ethanolic extracts. All extracts were tested antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*(ATTC 25923), *Escherichia coli* (ATTC 25922),and *Candida albicans*(ATTC 90028) by disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) of all extracts were measured by broth dilution method. The result showed that the ethanolic extract of *C.sappan* exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* with the highest inhibition zone of 22.67 ± 2.32 mm and 10.33 ± 0.58 mm, respectively. *P.Indica* extract exhibited highest antimicrobial activity against *C.albican* with the highest inhibition zone of 13.00 ± 0.00 mm. *M. siamensis* showed bacteriacidal activity against *S. aureus* with MIC and MBC of 0.019 mg/ml. Moreover, the MIC and MBC values for *C. sappan* against *E.coli* and *C.albican* were observed to be same (1.25 mg/ml and 0.625 mg/ml, respectively).All of extracts had less antimicrobial activity than Gentamicin and Amphotericin B. However, this results can supported STK to protect postpartum infection.

Keywords: Antimicrobial activity, Sa-Tri-Lhang-Klod, Postpartum infection

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของตำรับยาสตรีหลังคลอดและสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยา สำหรับดูแลการติดเชื้อหลังคลอด

ขวัญชนก หมอกมิต¹, ศรีโสภา เรืองหนู^{2,3}, อรุณพร อธิรัตน์^{2,3}

¹นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร (แพทย์แผนไทยประยุกต์) คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

²ภาควิชาแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

³ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัยแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

ตำรับยาสตรีหลังคลอดเป็นตำรับยาไทยที่ถูกบัญญัติอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติใช้ เป็นยา
ที่ช่วยในการขับน้ำคาวปลา ช่วยให้มดลูกเข้าอู่และช่วยในการไหลเวียนของเลือดในหญิงหลังคลอด
ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรเดี่ยว 17 ชนิด โดยยาตำรับนี้ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ
มาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดในตำรับยาสตรี
หลังคลอดและสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นส่วนผสมในตำรับ โดยศึกษาจากสารสกัดที่ได้จากการหมักด้วย
95% เอทานอล นำสารสกัดทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี disc diffusion หาค่าความ
เข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่
สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Escherichia coli*
(ATTC 25922) และ *Candida albicans* (ATTC 90028) พบว่าสารสกัดสมุนไพรฝางชั้น 95%
เอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* มากที่สุด โดยมีบริเวณที่สามารถยับยั้งถึง 22.67 ± 2.32
มิลลิเมตรและ 10.33 ± 0.58 มิลลิเมตรตามลำดับ สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงชั้น 95% เอ
ทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. albican* มากที่สุด โดยมีบริเวณที่สามารถยับยั้งได้ 13.00 ± 0.00
มิลลิเมตร สมุนไพรเดี่ยวที่มีค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด คือ ดอกสารภี (0.019
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ สารสกัดที่มีค่า MIC และ MBC เท่ากัน ต่อเชื้อ *E. Coli* และ
C. Albican ที่สุดคือ สารสกัดฝางชั้น 95% เอทานอล (1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.625
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) สารสกัดทั้งหมดยังคงมีฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพที่ต่ำกว่าเจนตาไม
ซินและแอมโอฟิเทอริซิน ปี อย่างไรก็ตามผลสรุปนี้สามารถสนับสนุนการใช้ตำรับยาในแพทย์แผน
ไทยสำหรับป้องกันการติดเชื้อหลังคลอด

คำสำคัญ: ตำรับยาสตรีหลังคลอด, ต้านเชื้อจุลชีพ, ติดเชื้อหลังคลอด

Introduction

Alternative medicines is now commonly used for several ailments including postpartum care because it is generally believed that herbal medicines are effective, safe, cheap and easily accesible. The use of medicinal plants in women's health related conditions such as pregnancy, postpartum healthcare and lactation have been documented for various ethnic groups⁽¹⁾.

"Sa-Tri-Lhang-Klod (STK)" is Thai traditional medicine and is in The National List of Essential Herbal Medicines (NLEM). It is used for postpartum care to excrete lochia, uterine involution and improving blood circulation. Besides, STK has been used to treat various symptoms in women such as irregular menstruation, postmenopausal symptoms, menopause, amenorrhea, abnormal blood circulation and inflammation in postpartum. STK consists of 17 plants and it has no report on antimicrobial activity. However, previous studies have reported that plant components of STK showed cytotoxic activity⁽²⁾. Preparation of STK consists of roots of *Maclura cochinchinensis* Lour. Corner, stems of *Artocarpus heterophyllus* Lam., rhizomes of *Curcuma comosa* Roxb., stems of *Caesalpinia sappan* Linn., vines of *Piper ribesoides* Wall., roots of *Plumbago indica* L., flowers of *P. longum* Linn., roots of *Angelica sinensis* Oliv. Diels, stems of *Salacia chinensis* L., fruits of *P. nigrum* Linn., roots of *P. samentosum* L., flowers of *Carthamus tinctorius* Linn., flowers of *Jasminum sambac* Ait., flowers of *Mimusops elengi* L., flowers of *Mesua ferrea* Linn., flowers of *Mammea siamensis* Kosterm., and flowers of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Each plants has been used in Thai traditional medicine as stimulator for blood circulation, blood tonic, anti-inflammation, and astringent in postpartum women for long time⁽³⁾.

Therefore, the objectives of this study was to investigate the antimicrobial activity of STK extract and its plant component extracts against three types of microorganism such as *S.aureus*, *E. coli*, and *C.albicans*. This study may provide scientific support to use STK for postpartum infection.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

Mueller-Hinton agar (MHA), Mueller-Hinton broth (MHB) and nutrient agar (NA) were purchased from Difco, USA. Resazurin was purchased from Sigma, USA. 95% Ethanol was purchased from CMJ Anchor Company, Thailand. Dimethyl sulphoxide (DMSO) was purchased from RCI Labscan, Thailand.

Plant materials and extraction

Plant materials of STK were collected from several parts of Thailand and their voucher specimens are presented in Table 1. The voucher specimens were deposited at the herbarium of Southern Center of Thai Medicinal Plants at Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand. Each plant materials were cleaned, sliced and dried in a hot air oven at 50°C.

Maceration

The crude specimens of STK and its ingredients were macerated in 95% ethanol for 3 days and filtered by Whatman No.1 filter paper. The macerated fluid was dried by rotary evaporator and repeated two times.

Determination of antimicrobial activities

Microbial strains: The microbial species, *S. aureus* (ATTC 25923), *E. coli* (ATTC 25922) and *C. albicans* (ATTC 90028) were used for this study. The cultures of bacteria were maintained at 4 °C throughout the study and used as stock cultures. The cultivation medium, MHA was used as base medium for the screening of antimicrobial activity. MHB was used for preparing inoculums. The antimicrobial test was performed in triplicate. Gentamicin and ampicillin were used as positive controls for the bacteria and amphotericin B for the fungus, DMSO was used as negative control. **Preparation of inoculums:** Each type of microorganism was streaked on a non-inhibitory NA plate to obtain isolated colonies and incubated at 37°C for 18-24 h for the bacteria and 36-48 h for the fungus. One single colony was selected with an inoculating loop, and transferred into 3 ml of MHB and incubated in a shaking incubator at 37°C for 2 h. The turbidity of bacteria was adjusted to 0.5 McFarland standards (1.5×10^8 CFU/ml) by MHB.

Preparation of test disc: The 95% ethanolic extracts of STK and its ingredients were dissolved in DMSO to a final concentration of 500 mg/ml and the aqueous extracts were dissolved in distilled water to a final concentration of 100 mg/ml and filtered with Millipore filter paper 0.22 µm. Then 10 µl of extracts was applied on sterilized paper disc (6 mm in diameter)

Disc diffusion method: This method was used to screen antimicrobial activity of the extracts⁽⁸⁾. Filter paper discs (6 mm in diameter) were impregnated with 10 µl of the extract (500 µg/ml in concentration). Air-dried discs were placed on inoculated MHA surface (for bacteria) and on Sabouraud dextrose agar (SDA) surface (for fungus). Positive controls in the present study were gentamicin and amphotericin B (1 mg/ml in concentration). These plates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria and at 30°C for 48 h for fungus. The zone of inhibition was calculated by measuring the diameter of the inhibition zone. Three different fixed directions were taken in triplicate and the average value was calculated.

Measurement of MIC and MBC: The MIC assay is a technique used to measure the lowest concentration of tested compound that can inhibit the growth of microbes⁽⁹⁾. This technique utilized the microdilution method in a 96-well microplate. Concisely, 50 µl of extract was diluted in two fold dilution in the well. The cultures were prepared from 18-24 h cultures of *S. aureus*, and *E. coli* and from 36-48 h cultures of *C. albicans* on broth cultures. The culture was diluted with MHB medium to 0.5 McFarland standard using densitometer, and 50 µl was added into each well and mixed well. After 16-18 h of incubation at 37°C, 10 µl of resazurin solution was added into each well and incubated further for 2 h. MIC of the present study was defined as the lowest concentration of the extract that prevented a color change in the 96-well microplate. The MBC of the present study was determined by sub-culturing the test dilution (that used in MIC) onto fresh solid medium and was incubated further for 24 h.

Table 1. Plants and part of plants component in STK.

Botanical name	Family	Plant collected from	Voucher specimen number	Part used	Thai traditional medicine used
<i>A. sinensis</i>	Umbelliferae	China	SKP199010901	Root	Blood tonic, menopause and premenstrual syndrome
<i>A. heterophyllus</i>	Moraceae	NakhonRatchasima	SKP117010801	Stem	Haemostatic, anti-inflammation, blood tonic and astringent
<i>C. sappan</i>	Leguminosae	Bangkok	SKP098031901	Stem	Blood tonic, menorrhagia, leucorrhoea and diabetes
<i>C. tinctorius</i>	Compositae	Chiang Mai	SKP051032001	Flower	Blood tonic, cardiac tonic and reduce cholesterol
<i>C. comosa</i>	Zingiberaceae	Phetchabun	SKP201030301	Rhizome	Menorrhagia, leucorrhoea, postpartum uterine bleeding and perimenopausal bleeding
<i>J. sambac</i>	Oleaceae	NakhonPathom	SKP129101901	Flower	Asthma, cardiac tonic and fatigue
<i>M. cochinchinensis</i>	Moraceae	PrachuapKhiri Khan	SKP117130301	Stem	Fever, antispasmodic and astringent
<i>M. siamensis</i>	Guttiferae	Ratchaburi	SKP083131901	Flower	Cardiac tonic, fever-lowering and enhancement of appetite
<i>M. ferrea</i>	Guttiferae	Ratchaburi	SKP083130601	Flower	Astringent, carminative, blood tonic and cardiac tonic
<i>M. elengi</i>	Sapotaceae	Ratchaburi	SKP171130501	Flower	Cardiac tonic, expectorate and sore throat
<i>N. nucifera</i>	Nelumbonaceae	Ratchaburi	SKP125141401	Pollen	Cardiac tonic, vertigo, faintness and fever
<i>P. longum</i>	Piperaceae	Chanthaburi	SKP146160301	Fruit	Carminative, element tonic and antidiarrheal
<i>P. Nigrum</i>	Piperaceae	Chanthaburi	SKP146161401	Fruit	Carminative, element tonic, expectorate and diuretic
<i>P. ribesioides</i>	Piperaceae	Sakhonnakhon	SKP146161801	Stem	Carminative, antifatulent and element tonic
<i>P. samentosum</i>	Piperaceae	Ratchaburi	SKP146161901	Root	Expectorant, carminative and flatulence
<i>P. indica</i>	Plumbaginaceae	Bangkok	SKP148160901	Root	Carminative, stomachache, antidiarrheic and hemorrhoids
<i>S. chinensis</i>	Celastraceae	Ratchaburi	SKP044190301	Stem	Blood tonic, cardiac tonic, carminative and muscle pain
STK	-	-	-	-	Amenorrhea, blood tonic, menopause and astringent

Results

The result showed that the ethanolic extract of *C.sappan* exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* with the highest inhibition zone of 22.67 ± 2.32 mm and 10.33 ± 0.58 mm, respectively and the extract of *P.Indica* exhibited antimicrobial activity against *C.albican* with the highest inhibition zone of 13.00 ± 0.00 mm. The MIC and MBC of the *M. siamensis* showed the highest activity

against *S. aureus* at 0.019 mg/ml and 0.019 mg/ml, respectively. Moreover, MIC and MBC of *C. sappan* showed the highest activity against *E. coli* at 1.25 mg/ml and 2.5 mg/ml, respectively and *C. albicans* at 0.625 mg/ml for both MIC and MBC. The 95% ethanolic extract of STK had no activity against *E. coli*. Nevertheless, the 95% ethanolic extracts of STK showed antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans* with inhibition zone of 9.33 ± 0.58 mm and 7.33 ± 0.58 mm, respectively. Moreover, both MIC and MBC of the 95% ethanolic extracts of STK against *S. aureus* were 0.625 mg/ml. Furthermore, MIC and MBC value of STK extract against *C. albicans* was observed to be same was 2.5 mg/ml. The antimicrobial activity of the 95% ethanolic extracts of STK and its plant ingredients by disc diffusion method are shown in **Table 2**. The MIC and MBC of the 95% ethanolic extracts of STK and its plant ingredients are shown in **Table 3**.

Table 2. Antimicrobial activity of the 95% ethanolic extracts of STK and its plant ingredients by disc diffusion method (mean \pm SD) (n=3).

Plants name	Inhibition zone (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<i>A. sinensis</i>	NI	NI	NI
<i>A. heterophyllum</i>	11.67 ± 0.58	NI	NI
<i>C. sappan</i>	22.67 ± 2.318	10.33 ± 0.58	11.33 ± 1.16
<i>C. tinctorius</i>	NI	NI	NI
<i>C. comosa</i>	NI	NI	NI
<i>J. sambac</i>	NI	NI	NI
<i>M. cochinchinensis</i>	12.00 ± 0.00	NI	NI
<i>M. ferra</i>	10.00 ± 0.00	NI	9.57 ± 0.58
<i>M. siamensis</i>	9.00 ± 0.00	NI	NI
<i>M. elengi</i>	NI	NI	NI
<i>N. nucifera</i>	NI	NI	NI
<i>P. longum</i>	9.67 ± 0.58	NI	NI
<i>P. Nigrum</i>	NI	8.33 ± 0.58	8.33 ± 0.58
<i>P. ribesioides</i>	8.33 ± 1.16	NI	NI
<i>P. samentosum</i>	NI	NI	NI
<i>P. indica</i>	20.00 ± 0.00	8.67 ± 0.58	13.00 ± 0.00
<i>S. chinensis</i>	10.00 ± 0.00	NI	NI
STK	9.33 ± 0.58	NI	7.33 ± 0.58
Gentamycin	22.00 ± 0.00	23.00 ± 0.00	NT
Amphotericin B	NT	NT	19.00 ± 0.00

NI=No inhibition, NT= Not tested

Table 3. MIC and MBC of the 95% ethanolic extracts of STK and its plant ingredients (n=3).

Plant name	MIC(mg/ml)/MBC(mg/ml)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<i>A. sinensis</i>	NI	NI	NI
<i>A. heterophyllus</i>	0.156/0.156	NI	NI
<i>C. sappan</i>	0.156/0.156	1.25/2.5	0.625/0.625
<i>C. tinctorius</i>	NI	NI	NI
<i>C. comosa</i>	NI	NI	NI
<i>J. sambac</i>	NI	NI	NI
<i>M. cochinchinensis</i>	0.625/0.625	NI	NI
<i>M. ferra</i>	0.15/0.15	NI	NI
<i>M. siamensis</i>	0.019/0.019	NI	NI
<i>M. elengi</i>	NI	NI	NI
<i>N. nucifera</i>	NI	NI	NI
<i>P. longum</i>	1.25/1.24	NI	NI
<i>P. Nigrum</i>	0.039/0.039	1.25/2.5	1.25/1.25
<i>P. ribesioides</i>	1.25/1.25	NI	NI
<i>P. samentosum</i>	NI	NI	NI
<i>P. indica</i>	2.5/2.5	2.5/2.5	1.25/1.25
<i>S. chinensis</i>	1.25/1.25	NI	NI
STK	0.625/0.625	NI	2.5/2.5
Gentamycin	0.125/0.125 (µg/ml)	NT	NT
Amphotericin B	NT	NT	1/1 (µg/ml)

NI = No inhibition, NT = Not tested

Discussion

The antimicrobial activities against bacteria and fungus of the 95% ethanolic extracts were studied by using disc diffusion method and determination of MIC and MBC. Bacteria and fungus are the cause of infection related to postpartum pyrexia. Previous studies showed the antimicrobial activities of *A. sinensis*⁽⁴⁾, *A. heterophyllus*⁽⁵⁾, *C. sappan*⁽⁶⁾, *M. siamensis*⁽⁷⁾, *Nelumbo nucifera*⁽⁷⁾ against *S. aureus* that are in line with the results of our study. Our results also showed that *M. siamensis* exhibited the highest antimicrobial activity against *S. aureus* with both MIC and MBC of 0.019 mg/ml (Table 3). *C. sappan* and *P. indica* had antimicrobial activities against all of three microbia, tested in this study (Table 2). Surprisingly, eventhough several herbs in STK showed antimicrobial activities, and that their antimicrobial activity should at least be additive when used as combination in STK, but the overall antimicrobial activity of STK was not more effective than some herbs in this preparation and that STK was not effective against *E. coli*. However, further study should be performed for the antimicrobial activity of STK other microorganisms to expand its spectrum. All extracts in this study had less antimicrobial activity than gentamicin and amphotericin B. However, the results of the present study can partially support the use of STK, a remedy in Thai traditional medicine for protection of postpartum infection.

Conclusions

The ethanolic extract of STK showed antimicrobial activity against one of the cause of postpartum infection, *S. aureus*. In addition, the ethanolic extract of some plants which were the ingredients in STK exhibited good antimicrobial activity, as well. Therefore, these results could be considered for adding more indication of STK in the NLEM of Thailand.

Acknowledgements

This work was supported by the National Research University Project of Thailand Office of Higher Education Commission and Center of Excellence on Applied Thai Traditional Medicine Research (CEATMR). Faculty of medicine, Thammasat University.

References

1. Meepradit, K (2011). Effect of postpartum herbal of Kab-Choeng hospital, Surin province Master thesis, Pharmaceutical Science, Silpakorn University, Thailand.
2. Inprasit J, Ruangnoo S, Itharat A. *In vitro* cytotoxic activity of Sa-Tri-Lhung-Klod remedy and its herbal ingredients on ovarian and cervical carcinoma cell lines. Journal of the Medical Association of Thailand. 2014;97 Suppl 8:S149-55.
3. Romano M, Cacciatore A, Giordano R, La Rosa B. Postpartum period: three distinct but continuous phases. Journal of Prenatal Medicine. 2010;4(2):22-5.

4. Han C, Guo J. Antibacterial and anti-inflammatory activity of traditional Chinese herb pairs, *Angelica sinensis* and *Sophora flavescens*. *Inflammation*. 2012;35(3):913-9.
5. Septama AW, Panichayupakaranant P. Antibacterial assay-guided isolation of active compounds from *Artocarpus heterophyllus* heartwoods. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(11):1608-13.
6. Kim KJ, Yu HH, Jeong SI, Cha JD, Kim SM, You YO. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;91(1):81-7.
7. Sattaponpan C, Kondo S. Antibacterial activity of crude extracts of **Prasaproya** formula and its components against pathogenic bacteria. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2011;94 Suppl 7:S153-61.
8. Lorian, V., 1996. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th Edn., Williams and Wilkins, Baltimore, London, ISBN: 9780781749831.
9. Sarker, S. D., Nahar, L., and Y. Kumarasamy (2007). Microtiter plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321-4.

B21

The Effect of Monosodium Glutamate on Sex Ratio and Reproductive Organ of Zebra Fish

Naowarat Suthamnatpong¹, Jutanat Srisamran², Chanon Yan², Yoothasak Kranboon², Wachira Yusoontorn², Noppadon Pirarat³, Aranya Ponpornpisit⁴

¹Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²6th grade students, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

³Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

⁴Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Abstract

Nowadays, food additives, including monosodium glutamate (MSG) are widely used in food industry and household units. The studies of the effect of over-consumption of MSG on the reproductive organs were still controversial. In this study, zebrafish, a useful model organism for the study of vertebrate biology, was used to observe the effects of MSG on the sex ratio and reproductive organs. The 10-day-old zebrafishes were divided into 5 groups, group 1 was negative control which carbon-filtered water was used without any other substances. Group 2 was positive control in which ethinylestradiol solution 10 µg/L was added. Group 3-5 were the experimental groups in which 0.001%, 0.01% and 0.1% of MSG were added respectively. The experiment was conducted for 60 days to study the effect of tested substances on the sex ratio and other abnormalities of reproductive organs of the zebrafish. The result showed that male to female ratios for group 1-5 were 9:1, 3:7, 7:3, 6:4 and 5:5, respectively. The animals treated with 0.01% and 0.1% MSG had significantly male:female ratios lower than negative control group. In conclusion, exposure to MSG has an impact on the reproductive organs of zebra fish and tends to increase the number of female zebra fish. Further studies are necessary in order to elucidate the detailed mechanism of this toxicity and to draw a conclusion on a causal association between the MSG intake and the abnormality in sex ratio and reproductive organ of zebra fish.

Keywords: zebrafish, monosodium glutamate, sex ratio, sexual development

ผลของสารละลายผงชูรสต่ออัตราส่วนเพศและระบบสืบพันธุ์ของปลาหม้าลาย

เนาวรัตน์ สุธัฒนาภพพงษ์¹, จุฑานาถ ศรีสำราญ², ชานนท์ หย่น², ยุทธศักดิ์ กรานบุญ², วชิรา อยู่สุนทร², นพดล พิหารัตน์³, อรัญญา พลพรพิสิฐ⁴

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²นิสิตชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

³ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

⁴ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีการใช้วัตถุเจือปนอาหาร (food additives) รวมถึงผงชูรส (monosodium glutamate หรือ MSG) กันอย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและในครัวเรือน จากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่ามีทั้งที่สนับสนุนและไม่สนับสนุนการบริโภค MSG งานวิจัยนี้ใช้ปลาหม้าลายซึ่งเป็นสัตว์ที่มีประโยชน์ในการศึกษาทางด้านชีววิทยาของสัตว์มีกระดูกสันหลัง เพื่อทดสอบผลของ MSG ต่ออัตราส่วนเพศและระบบสืบพันธุ์ของปลาหม้าลาย โดยทำการแบ่งกลุ่มปลาหม้าลายวัยอ่อนอายุ 10 วันออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมลบที่เลี้ยงในน้ำกรองคาร์บอนโดยไม่เติมสารเคมีใด ๆ (carbon filtered water) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมบวกซึ่งใส่สารละลายเอthinyl เอสตราไดออล (ethinyl estradiol solution) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร กลุ่มที่ 3-5 เติม MSG ที่ความเข้มข้น 0.001%, 0.01% และ 0.1% ตามลำดับ จากนั้นเลี้ยงปลาเป็นเวลานาน 60 วัน เพื่อดูผลกระทบต่ออัตราส่วนเพศและความผิดปกติอื่นๆของอวัยวะสืบพันธุ์ ผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนปลาเพศผู้ต่อปลาเพศเมียของกลุ่มที่ 1-5 เท่ากับ 9:1, 3:7, 7:3, 6:4 และ 5:5 ตามลำดับ พบว่าค่าที่ได้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมลบกับกลุ่มที่ 4, 5 และกลุ่มควบคุมบวกกับกลุ่มที่ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า MSG มีผลต่ออวัยวะสืบพันธุ์ของปลาหม้าลาย โดยมีแนวโน้มทำให้อัตราส่วนปลาเพศเมียสูงขึ้น อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบถึงกลไกการเกิดพิษ และยืนยันความล้มพันธ์เชิงสาเหตุว่าผงชูรสมีส่วนเกี่ยวข้องกับความผิดปกติในอัตราส่วนเพศและอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาหม้าลาย

คำสำคัญ : ปลาหม้าลาย, ผงชูรส, โมโนโซเดียมกลูตาเมต, อัตราส่วนเพศ, พัฒนาการระบบสืบพันธุ์

บทนำ

ในปัจจุบันมีการใช้วัตถุเจือปนอาหาร เช่น ผงชูรส กันอย่างแพร่หลาย ทั้งในภาคอุตสาหกรรมขนาดใหญ่และในครัวเรือนขนาดย่อม เนื่องจากยุคสมัยที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ผู้คนต้องใช้ชีวิตแข่งขันกับเวลามากขึ้น โอกาสที่แต่ละครอบครัวทำอาหารรับประทานเองน้อยลง ดังนั้นจึงมีการซื้ออาหารจากร้านอาหารเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผงชูรสกลายเป็นส่วนหนึ่งของการบริโภคของผู้คนอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ เหตุผลอีกประการหนึ่งที่ส่งเสริมให้มีการใช้ผงชูรสมากขึ้น คือการเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตผงปรุงสำเร็จรูปเพื่อตอบสนองความต้องการ และเพิ่มความสะดวกสบายให้แก่ผู้คนในปัจจุบันที่มีมากขึ้นนั่นเอง

ผงชูรส (monosodium glutamate หรือ MSG) เป็นวัตถุเจือปนอาหารที่มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น สูตรทางเคมีคือ $C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$ เป็นเกลือของกรดกลูตามิก สามารถละลายในน้ำ แยกตัวให้โซเดียมและกลูตาเมต ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในอาหารทั่วไป แต่อาจมีปริมาณลดลงจากการขนส่งและเก็บรักษา ดังนั้นการเติมผงชูรสลงในอาหารจึงเพิ่มปริมาณกลูตาเมตที่สูญเสียไป และกระตุ้นต่อมรับรสทำให้รับรสชาติได้ดีขึ้น

องค์การอนามัยโลกได้กำหนดค่าระดับที่ยอมรับได้ต่อวัน (acceptable daily intake หรือ ADI) ของผงชูรสให้อยู่ในกลุ่ม not specified เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำมาก แต่มีรายงานการแพ้ผงชูรสในประเทศสหรัฐอเมริกา¹ ซึ่งสรุปว่าการบริโภคผงชูรสอาจนำมาให้เกิดหลอดลมตีบ (bronchospasm) ได้ในผู้ป่วยบางรายที่เป็นโรคหืดหอบรุนแรง (severe unstable asthma) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับกลุ่มอาการ Chinese restaurant syndrome (CRS) ที่เกิดขึ้นหลังจากบริโภคผงชูรส โดยมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ.1968 และหลังจากนั้นได้มีรายงานตามมามากมาย ผลงานการวิจัยผลกระทบของผงชูรสต่อสุขภาพ พบว่ามีทั้งที่สนับสนุนว่าการผงชูรสทำให้เกิดกลุ่มอาการ CRS²⁻⁵ และที่ไม่สนับสนุนว่าผงชูรสทำให้เกิดกลุ่มอาการ CRS⁶⁻⁹

นอกจากการทดสอบผลข้างเคียงของผงชูรสในมนุษย์แล้ว ยังมีงานวิจัยที่ทำในสัตว์ทดลองเช่นกัน มีการศึกษาผลของผงชูรสต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อรังไข่ของหนู Wistar rat ระยะโตเต็มวัย พบว่าผงชูรสสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อรังไข่ และนำมาให้หนูเกิดภาวะความไม่สมบูรณ์พันธุ์ได้¹⁰ นอกจากนี้ยังมีการทดลองเกี่ยวกับผลของผงชูรสต่ออวัยวะสืบพันธุ์ของหนูเพศผู้¹¹ พบว่าหนูทดลองที่ได้รับผงชูรส (6 กรัมต่อกิโลกรัม) มีน้ำหนักของถุงเก็บตัวสุจิใกล้อัมชะ (seminal vesicle) ปริมาณเทสโทสเตอโรน (testosterone) และตัวสุจิลดลง

ปลาหมอลาย (Danio rerio) เป็นสัตว์ที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้เป็นสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ในปัจจุบันมีการสนับสนุนให้ใช้ปลาหมอลายทดแทนการใช้หนูทดลองมากขึ้น (replacement species) เนื่องจากปลาหมอลายเป็นปลาขนาดเล็ก ดูแลง่าย มีวงจรชีวิตที่สั้นกว่าสัตว์ทดลองชนิดอื่นๆ โดยใช้เวลา 2-3 วันหลังปฏิสนธิออกมาจากไข่การเปลี่ยนแปลงทางเพศเกิดขึ้นหลังจากปฏิสนธิประมาณ 10 วัน ในระยะเริ่มแรกปลาหมอลายเป็นเพศเมียทั้งหมด การ

เปลี่ยนแปลงทางเพศของปลาฆ่าตายไปเป็นเพศเมียจะสมบูรณ์หลังจากปฏิสนธิ 35 วัน ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเพศผู้โดยสมบูรณ์ เกิดขึ้นหลังจากปฏิสนธิ 45 วัน

จากสถานการณ์การใช้ผงชูรสกันปริมาณมากทั่วโลกและจากข้อมูลการศึกษาซึ่งพบว่า ผงชูรสมีแนวโน้มที่จะเป็นสารในกลุ่ม endocrine disrupters¹²⁻¹⁴ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของผงชูรสต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลาฆ่าตาย เพื่อให้เกิดความตระหนักและทราบถึงความสำคัญของผงชูรสที่อาจมีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงของระบบสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ปลาฆ่าตายวัยอ่อน (larvae) อายุ 10 วันหลังฟัก (10 dph) ได้จากการนำปลาฆ่าตายพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์แข็งแรงจากฟาร์มเลี้ยงปลาแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐมมาเลี้ยงไว้เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 1 เดือน ใช้น้ำกรองคาร์บอนในการเลี้ยง จากนั้นนำปลาฆ่าตายพ่อแม่พันธุ์อย่างละ 10 ตัว นำลงตู้ฟักไข่ปลาทิ้งไว้เป็นเวลาหนึ่งคืน เก็บไข่ปลาฆ่าตายในวันถัดมา นำมาแยกใส่ในตู้ปลาจำนวน 4 ตู้ ตู้ละ 100 ฟอง ให้อากาศผ่านหัวทรายเป็นเวลา 3 วัน จนลูกปลาฆ่าตายฟักเป็นตัว เลี้ยงไว้เป็นเวลา 10 วัน จึงนำมาทดสอบ

ใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 1631007

วิธีการทดลอง

การเลี้ยง เลี้ยงแบบ static renewal system ใช้ลูกปลาที่ได้จากการฟักในหัวข้อสัตว์ทดลอง 200 ตัว เริ่มเลี้ยงที่อายุ 10 dph ถึง 60 dph ในน้ำกรองคาร์บอน (carbon filtered water) ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ตู้ที่มีความจุน้ำขนาด 15 ลิตร เติมน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงจำนวน 10 ลิตร โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 % จากนั้นเติมน้ำทดสอบในปริมาณ 50 % ทุก ๆ 5 วัน ตรวจสอบและเก็บบันทึกข้อมูลคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH) หลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ

การให้อาหาร เมื่อลูกปลาฆ่าตายฟักเป็นตัว ให้อาหารผงเตตรามิน (TetraMin[®]) สลับกับอาร์ทีเมียวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น เมื่อปลามีขนาดใหญ่ขึ้นให้หนอนแดง (bloodworm) เสริมพร้อมกับการให้อาหารแบบปกติ

วิธีการทดลอง แบ่งปลาออกเป็น 5 กลุ่มกลุ่มละ 20 ตัวทำการทดลอง 2 ซ้ำทุกกลุ่มการทดลองโดยเริ่มใส่ MSG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในปลาฆ่าตายอายุ 10 วัน

งานวิจัยนี้ใช้ MSG 3 ความเข้มข้น คือ 0.001 %, 0.01 % และ 0.1 % ซึ่งเท่ากับความเข้มข้นระดับต่ำกว่าค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมงในระยะเอมบริโอ 1000, 100, และ 10 เท่าตามลำดับ ทั้งนี้ค่า LD₅₀ ที่ใช้อ้างอิงจากค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 1.039 %¹⁵

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมลบ เลี้ยงโดยใช้น้ำกรองคาร์บอนเท่านั้นตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมบวก ใส่สารละลายเอธินิลเอสตราไดออล 10 µg/L

กลุ่มที่ 3 MSG 0.001 %

กลุ่มที่ 4 MSG 0.01 %

กลุ่มที่ 5 MSG 0.1 %

เมื่อครบกำหนดทำการการุณยฆาตด้วยยาสลบ 2-Phenoxyethanol (2-PE) [1-hydroxy-2-phenoxyethane] เก็บตัวอย่างปลาทดลองแช่ในฟอร์มาลิน 10 % เฉพาะปลาที่จะทำการย้อมสี (hematoxylin and eosin staining; H & E) จำนวนกลุ่มละ 4 ตัว ทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาโดยศึกษาสไลด์ตัวอย่างแบบสด (wet mount) กับปลาที่เหลืออยู่ของแต่ละกลุ่ม และสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสี H & E เพื่อดูเพศปลาและความผิดปกติอื่น ๆ ของอวัยวะสืบพันธุ์

การศึกษาด้วยสไลด์ตัวอย่างแบบสด นำตัวอย่างปลามาผ่าเพื่อนำส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ที่อยู่ในช่องท้องบริเวณด้านท้ายใต้ถุงลมออกมา จากนั้นนำไปวางบนสไลด์ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงบันทึกจำนวนเพศที่พบและดูความผิดปกติ

การศึกษาด้วยสไลด์ตัวอย่างย้อมสี H&E นำตัวอย่างปลาที่ได้ไปตัดแต่งให้ได้ส่วนที่ต้องการบริเวณด้านท้ายของช่องท้องปลาแยกใสในตลับใส่ชิ้นเนื้อ นำตลับใส่ชิ้นเนื้อทุกกลุ่มมาล้างด้วยน้ำก๊อกไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำตลับใส่ชิ้นเนื้อเข้าเครื่อง tissue processor และทำพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง tissue embedding นำพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อที่ได้ไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบมีหมุนในแนวขวาง (cross-section) ให้ได้เป็นแผ่นเนื้อเยื่อหนา 2-5 ไมครอน วางบน floating bath ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำแผ่นสไลด์มาซ้อนแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ดังกล่าว แล้วนำไปอบในตู้อบสไลด์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที แล้วจึงนำไปย้อมสี H & E ตามขั้นตอน จากนั้นนำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อจำแนกเพศและศึกษา

การแยกเพศปลาม้าลายทางจุลพยาธิวิทยา แยกเพศโดยผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงหาอวัยวะสืบพันธุ์ที่อยู่บริเวณด้านท้ายของช่องท้องใต้ส่วนของกระเพาะลม (swim bladder) ส่วนของการศึกษาด้วยสไลด์ตัวอย่างแบบสดปลาเพศผู้ พบส่วนของอัณฑะ (testis) เป็นลักษณะท่อนหลายๆท่อประกอบกัน และยังสามารถพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เคลื่อนไหวได้ ปลาเพศเมียพบลักษณะของรังไข่ (ovary) ที่เจริญเป็นพวงประกอบด้วยไข่ (oocyte) หลายระยะ

การศึกษาโดยสไลด์ตัวอย่างย้อมสี H & E ปลาเพศผู้พบส่วนของอัณฑะที่ติดสีค่อนข้างม่วง มีลักษณะของการติดสีที่ค่อนข้างชัดเจน และเซลล์สืบพันธุ์เรียงตัวกันแน่นเห็นเป็นท่อเช่นกัน ในปลาเพศเมีย พบลักษณะของรังไข่เป็นกลุ่มของไข่หลายระยะ ซึ่งมีการติดสีแตกต่างกันไปตามแต่ละระยะอย่างชัดเจน

นอกจากนี้ยังมีวิธีแยกปลาที่มีทั้งสองเพศ (intersex) ได้ โดยการประเมินจากการดูอัณฑะที่พบเซลล์ไข่¹⁶ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ไม่สมบูรณ์ หลังจาก 45 วัน โดยในการทดลองนี้ไม่พบปลาที่มีทั้งสองเพศ

การเก็บข้อมูล

ข้อมูลในการทดลองแบ่งเก็บเป็น 2 แบบ

1. ข้อมูลระหว่างการทดลอง เช่น อุณหภูมิ อัตราการรอด ความผิดปกติที่พบและค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH)

2. ข้อมูลหลังสิ้นสุดการทดลอง เช่น อัตราส่วนเพศที่ได้จากสไลด์ตัวอย่างแบบสดและสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสี H & E และความผิดปกติที่พบทางจุลพยาธิวิทยา

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของอัตราส่วนจำนวนเพศผู้ต่อเพศเมียเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้ Chi-square test กำหนดให้มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$

ผลการศึกษาแสดงในรูปอัตราส่วนจำนวนเพศผู้ต่อเพศเมียและเปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์แนวโน้มของอัตราการรอดในแต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อครบ 60 วัน โดยดูเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดเทียบกับปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่ได้จัดบันทึกไว้ของแต่ละกลุ่มการทดลอง

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เลี้ยงปลาฆ่าตายตั้งแต่วัยอ่อนจนถึงระยะโตเต็มวัยเป็นเวลานาน 60 วัน พบว่าตลอดการเลี้ยงคุณภาพน้ำในทุกกลุ่มการทดลองค่อนข้างคงที่โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 29.4 องศาเซลเซียสและค่า pH เฉลี่ย 7.48 - 7.6 ซึ่งอยู่ในค่ามาตรฐานการเลี้ยงปลาในสัตว์ทดลอง¹⁶

สำหรับอัตราการตายพบว่ากลุ่มการควบคุมที่ใช้น้ำกรองคาร์บอน (กลุ่ม1) มีอัตราการเฉลี่ย 67.5% กลุ่มควบคุมบวกที่ใส่สารละลายเอธินอลเอสตราไดออล (กลุ่ม2) มีอัตราการรอด 82.5% และกลุ่มทดสอบMSG ที่ความเข้มข้น 0.001%, 0.01%, 0.1% (กลุ่มที่3-5) มีอัตราการรอด 75 %, 27.5 % และ 25% ตามลำดับ (ตารางที่1)

ตารางที่ 1 อัตราการรอด) survival rate ของปลาฆ่าตายเมื่อครบ (60 วัน

กลุ่มทดสอบ	Total Fish at 0	Total Fish at 60	Survival Rate (%)
	dph (n)	dph (n)	
1 Negative control	40	27	67.5
2 Positive control	40	34	82.5
3 MSG 0.001%	40	33	75
4 MSG 0.01%	40	11	27.5
5 MSG 0.1%	40	10	25

จากการทดลองผลของ MSG ต่อสัดส่วนของการเปลี่ยนแปลงเพศที่ศึกษา โดยวิธีการทำ fresh smear จากเนื้อเยื่อและวิธีการทำสไลด์ทางวิทยาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (histology) ได้ผลการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 พบจำนวนปลาเพศผู้ 23 ตัว (85.2%) ตัวเมีย 4 ตัว (14.8%) จากตัวอย่างในวันที่ 60 dph จำนวน 27 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 พบจำนวนปลาเพศผู้ 11ตัว (32.4%) เพศเมีย 23 ตัว (67.6%) จาก 34 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 3 พบจำนวนปลาเพศผู้ 23 ตัว (69%) เพศเมีย10 ตัว (31%)

จาก 33 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 4 พบจำนวนปลาเพศผู้ 7 ตัว (63.6%) เพศเมีย 4 ตัว (36.4%) จาก 11 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 5 พบจำนวนปลาเพศผู้ 5 ตัว (50%) เพศเมีย 5 ตัว (50%) จาก 10 ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Chi square พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมลบกับกลุ่มการทดลองที่ 1, 2 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมบวกกับกลุ่มการทดลองที่ 5 (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

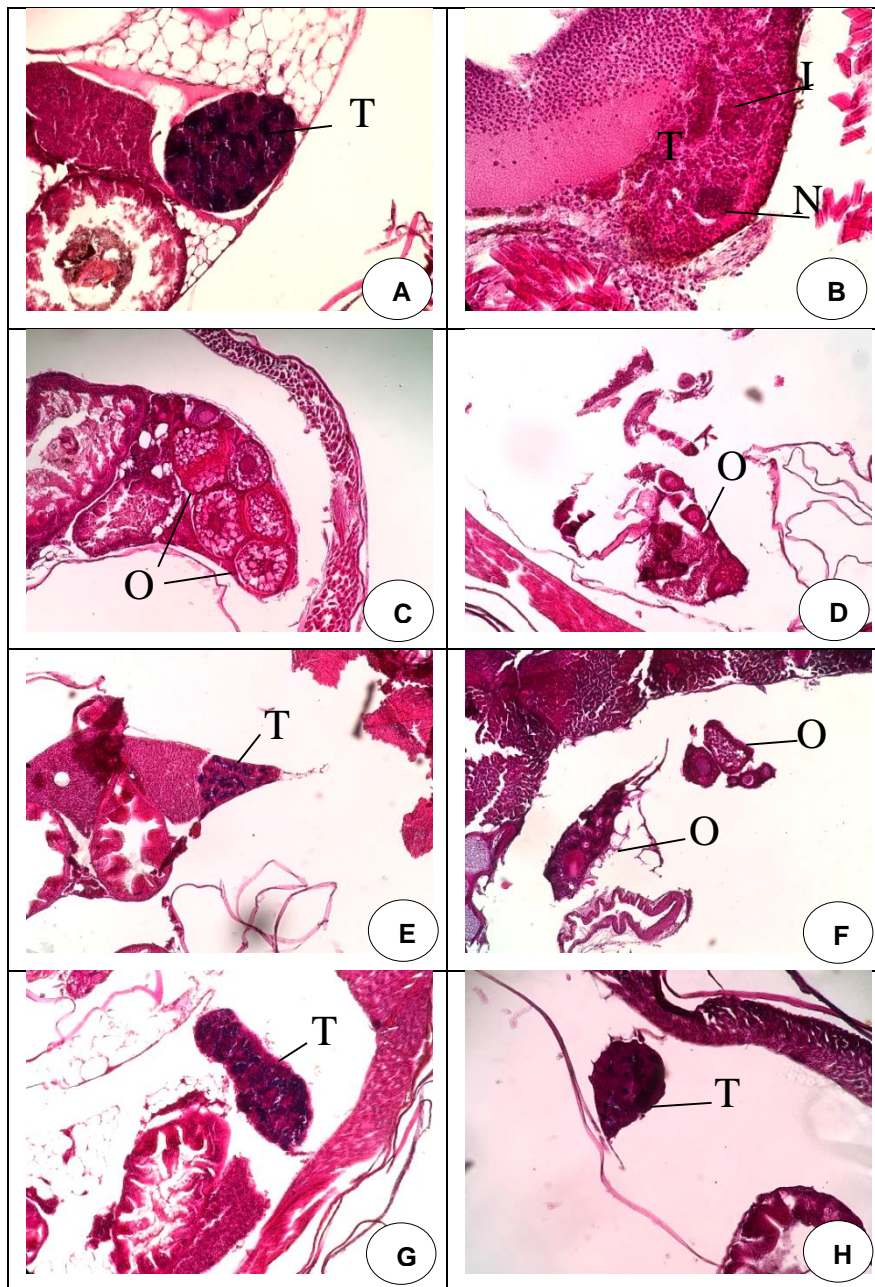
ตารางที่ 2 อัตราส่วนเพศของปลาม้าลายในแต่ละกลุ่มการทดลอง

กลุ่มทดสอบ	Total Fish at 60 dph (n)	Male Sample (%)	Female Sample (%)
1 Negative control	27	23 (85.2%)* ^a	4 (14.8%)* ^a
2 Positive control	34	11 (32.4%)* ^b	23 (67.6%)* ^b
3 MSG 0.001%	33	23 (69%)* ^b	10 (31%)* ^b
4 MSG 0.01%	11	7 (63.6%)* ^a	4 (36.4%)* ^a
5 MSG 0.1%	10	5 (50%)* ^a	5 (50%)* ^a

*^aหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ

*^bหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก

ผลการตรวจเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาม้าลายกลุ่มควบคุมลบ กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มที่ทดสอบด้วย MSG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบเนื้อเยื่อปกติของรังไข่และอวัยวะของปลาแต่ละตัวแยกกัน ทั้งนี้ไม่พบเนื้อเยื่อที่เป็นสองเพศในปลาตัวเดียวกัน พบการอักเสบและเกิดเนื้อตายของเนื้อเยื่ออวัยวะของปลาในกลุ่มควบคุมบวกจำนวน 1 ตัว (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ปลาทรายดำลายกลุ่ม A กลุ่มควบคุมลบ กลุ่ม B-C กลุ่มควบคุมบวก กลุ่ม D-E (MSG 0.001%) กลุ่ม F-G (MSG 0.01%) กลุ่ม H (MSG 0.1%) O=Ovary, T=Testis, N=Necrosis, I=Inflammation (กำลังขยาย 10 เท่า H&E stain)

วิจารณ์

ปัจจุบัน กลไกที่ทำให้ปลาฆ่าตายเปลี่ยนแปลงเพื่อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีรายงานว่า การเกิดเพศของปลาฆ่าตายไม่ได้ถูกควบคุมโดยโครโมโซม แต่อาจเกี่ยวข้องกับยีนหลายตัว เช่น *dmrt1*, *sox9a*, *amh*, *wt1*, *ftz-f1*, *gata*¹⁷⁻¹⁹ รวมถึงการทำงานของเอนไซม์และฮอร์โมนเพศ และปัจจัยจากสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ²⁰⁻²⁴

ในภาวะปกติ ระบบสืบพันธุ์ของปลาฆ่าตายในช่วง 20 วันแรกเกิด มีการเจริญของเนื้อเยื่อคล้ายรังไข่ เมื่อลูกปลาฆ่าตายมีอายุประมาณ 20-25 วัน ลูกปลาฆ่าตายจำนวนครึ่งหนึ่งเกิดการฝ่อของเนื้อเยื่อคล้ายรังไข่ เกิดการเจริญขึ้นของเนื้อเยื่ออวัยวะ และเปลี่ยนเป็นปลาเพศผู้ ในขณะที่ลูกปลาที่เหลือจะมีพัฒนาการของรังไข่เป็นปลาเพศเมียต่อไป

มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์อะโรมาเทสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ เอสโตรเจนและยับยั้งการทำงานของเทสโทสเตอโรน พบว่าในช่วงที่มีการเปลี่ยนจากปลาเพศเมียเป็นปลาเพศผู้ นั้น มีการลดลงของการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากนี้ อุณหภูมิการเลี้ยงปลาที่สูงกว่า 28 องศาเซลเซียส ก็มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโรมาเทส ทำให้การทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง และการทำงานของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเพิ่มขึ้น ทำให้ปลาเพศผู้มีจำนวนมากขึ้น²²⁻²⁴

จากการทดสอบผลของ MSG ต่อการเปลี่ยนเพศในปลาฆ่าตายในการศึกษานี้ พบว่า MSG ที่ความเข้มข้น 0.01% และ 0.1% ทำให้อัตราส่วนจำนวนปลาเพศเมียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแปรผันตามระดับความเข้มข้นของ MSG ที่ทดสอบ ทั้งนี้ การที่ปลาที่ได้รับ MSG ในระดับสูงมีอัตราส่วนปลาเพศเมียมากขึ้น อาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อะโรมาเทส เนื่องจากมีรายงานว่า MSG มีผลกระตุ้น *aromatase-based reporter gene*²⁵ ที่สมองของปลาฆ่าตาย ทำให้มีการสังเคราะห์เอสโตรเจนมากขึ้นและยับยั้งการทำงานของเทสโทสเตอโรน ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อรังไข่มีพัฒนาการมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงอายุก่อน 45 dph จึงทำให้อัตราส่วนปลาเพศเมียเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าตัวอ่อนของปลาฆ่าตายที่สัมผัสกับ MSG ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีความพิการแรกเกิดหลายประการ ได้แก่ หัวใจผิดปกติ (*elongated heart*) เยื่อหุ้มหัวใจบวม (cardiac sac edema) ถุงไข่แดงบวม (yolk sac edema) กระดูกสันหลังคด (*spinal kyphosis*)²⁶ ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ อัตราการรอดตายของปลาฆ่าตายในกลุ่มที่ 4 (MSG 0.01%) และกลุ่มที่ 5 (MSG 0.1%) ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 3 (MSG 0.001%) และกลุ่มควบคุม อาจเกิดจากความเครียดที่กล่าวมา อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่า อัตราการรอดของปลาฆ่าตายในกลุ่มควบคุมลบของการศึกษาในครั้งนี้ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากในระยะแรกของการทดลอง ซึ่งเป็นระยะที่ลูกปลามีขนาดเล็กมากนั้น มีลูกปลาจำนวนหนึ่งหลุดออกไปจากระบบในระหว่างที่ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในกลุ่มดังกล่าว

การศึกษานี้พบว่า อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนเป็นเพศผู้ของปลาฆ่าตาย โดยพบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนปลาเพศผู้สูงมากผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่ 1 (negative control) มีจำนวนปลาเพศผู้สูงถึง 85.2% ซึ่งน่าจะเป็นผลที่เกิดจากอุณหภูมิที่สูงในช่วงที่ทำการทดลอง (อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 29.4 °C) ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนเป็นเพศผู้ของปลาฆ่าตายนี้

สอดคล้องกับการทดลองของ Abozaid, H²⁷ ในปีค.ศ. 2011 ซึ่งระบุว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปลาหมึก
ลายเปลี่ยนเป็นเพศผู้มากขึ้น แต่ pH ในการเลี้ยงที่เหมาะสมไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนเพศ²⁸ การเลี้ยง
ปลาที่อุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโรมาเทส ทำให้การ
ทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง และการทำงานของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเพิ่มขึ้น ทำให้
ปลาเพศผู้มีจำนวนมากขึ้น^{22,24} แต่ถ้าตัดปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิออกไป จะพบว่ากลุ่มที่ได้รับ
MSG 0.01% และ MSG 0.1% มีอัตราส่วนปลาเพศเมียมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ

ผลการทดลองในครั้งนี้บ่งชี้ว่า MSG มีผลต่อกระทบต่อระบบสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศ
ของปลาหมึกลาย โดยมีแนวโน้มทำให้อัตราส่วนปลาเพศเมียเพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Raiten DJ, Talbot JM, Fisher KD. Executive summary from the report : analysis of adverse reactions to monosodium glutamate (MSG). J Nutr 1995;125(11): 2891S-2906S.
2. Schaumburg H. Chinese restaurant syndrome. New Engl J Med.1968;278:1122.
3. Kenney RA, Tidball CS. Human susceptibility to oral monosodium glutamate. Am J Clin Nutr. 1972;25:140-6.
4. Gore ME, Salmon PR. Chinese restaurant syndrome: fact or fiction? Lancet. 1980;1: 251-52.
5. Yang WH, Drouin MA, Herbert M, Mao Y, Karsh J. The monosodium glutamate symptom complex : assessment in a double-blind placebo-controlled, randomised study. J Allergy Clin Immunol. 1997;99:757-62.
6. Zanda G, Franciosi P, Tognoni G, Rizzo M, Standen SM, Morselli PL, et al. A double blind study on the effects of monosodium glutamate in man. Biomed. 1973;10:202-4.
7. Wilkin JK. Does monosodium glutamate cause flushing (or merely 'glutamina')? J Am Acad Dermatol. 1986;15: 225-30.
8. Tarasoff L, Kelly MF. Monosodium L-glutamate: a double-blind study and review. Food Chem Toxic. 1993;31:1019-35.
9. Geha RS, Beiser A, Ren C, Patterson R, Greenberger PA, Grammer LC, et al. Multicentre, double-blind, placebo-controlled, multiple-challenge evaluation of

- reported reactions to monosodium glutamate. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106: 973-80.
10. Eweka A, Om·Iniabo F. Histological studies of the effects of monosodium glutamate on the ovaries of adult Wistar rats. *Ann Med Health Sci Res.* 2011;1(1):37-43.
 11. Lamsaard S. The sensitivity of male rat reproductive organs to monosodium glutamate. *Acta Med. Acad.* 2014;43(1):3-9.
 12. Anderson L, Holbech H, Gessbo A, Norrgren L, Petersen G. Effect of exposure to 17-alpha-ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogen in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 2003;134:365-74.
 13. Orn S, Holbech H, Madsen TH, Norrgren L, Petersen GI. Gonad development and vitellogen in production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aqua toxicol* 2003;65:397-411.
 14. Fenske M, Segner H. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 2004;67:105-126.
 15. Ponpornpisit A, Suthamnatpong N. Toxicity of monosodium glutamate on Zebra fish embryo (*Danio rerio*). *ISBENS* 2016 Jul:94
 16. OECD. Test No. 234: Fish Sexual Development Test, OECD Publishing, Paris. 2011;1-44.
 17. Von Hofsten J, Olsson PE. Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005;3:63.
 18. Jørgensen A, Morthorst JE, Andersen O, Rasmussen LJ, Bjerregaard, P. Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2008;6:25.
 19. Rodriguez-Mari A, Canestro C, Bremiller RA, Nguyen-Johnson A, Asakawa K et al: Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. *PLoS Genet.* 2010;6: e1001034.
 20. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish zebrafish (*Danio rerio*), 3rd edition. Eugene, OR, University of Oregon Press. 1995.
 21. Hill RL, Janz DM. Developmental estrogenic exposure in zebrafish, *Danio rerio*: I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aqua Toxicol.* 2003;63:417-29.
 22. Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2004;137:11-20.

23. Shang EH, Yu RM, Wu RS. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish, *Danio rerio*. *Environ Sci Technol.* 2006.1;40(9):3118-22.
24. Abozaid HAA. Temperature dependent sex determination. In *Zebrafish (Danio rerio)*. Dissertation, in the international Ph. D. program for agricultural sciences in Goettingen (IPAG) at the faculty of agricultural sciences, Georg-August-University Göttingen, Germany. 2012.
25. Abdelkader TS, Seo-Na C, Tae-Hyun K, Juha S, Dongso K and Park JH. Teratogenicity and brain aromatase-induction of monosodium glutamate in estrogen-responsive mosaic transgenic zebra fish *Danio rerio*. *Afr J Biotech.* 2012; 11(48):10816-23.
26. Tamer SA. Teratogenicity and brain aromatase-induction of monosodium glutamate in estrogen-responsive mosaic transgenic zebra fish *Danio rerio*. **Afr. J. Biotechnol.** 2012;11(48):10816-23.
27. Abozaid H, Wessels S, Hörstgen-Schwark G. Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish (*Danio rerio*). *Sex Dev.* 2011;5:259-65.
28. Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquac.* 2007;269(1-4):1-20.

B22

Association of *ABCB1* C3435T Polymorphism with Clinical Outcome of Risperidone in Thai Patients with Schizophrenia

Watcharadanai Traisuwan¹, Padungkiet Chawanakrasaeson², Nattaphon Chokemaitree², Wanida Rattanasumawong², Ratchanee Rodsiri¹, Pornpimol Kijsanayotin¹.

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Psychiatry and Neurology, Phramongkutklao Hospital, Bangkok 10400, Thailand

Abstract

P-glycoprotein (P-gp) is found in the blood-brain barrier and plays an important role in preventing diffusion of drugs into the brain. It is still controversial as to whether the presence of *ABCB1*C3435T polymorphism has an impact on the efficacy of risperidone treatment. Therefore, the purpose of this study was to investigate the association between *ABCB1*C3435T and clinical treatment outcome of risperidone assessed by PANSS scores. This observational prospective study was conducted in 50 schizophrenic patients receiving risperidone monotherapy at Phramongkutklao Hospital. Clinical data and blood samples of the patients were collected. Genomic DNA was genotyped for *ABCB1*C3435T variant. The association between *ABCB1* C3435T variant and risperidone clinical outcome as PANSS scores after two-week treatment was determined using independent sample Student's *t*-test. The genotype results showed that 18 patients had CC genotype, 25 patients had CT genotype and 7 patients had TT genotype. The genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium. The association study showed that *ABCB1*C3435T was associated with clinical improvement of patients with schizophrenia. Patients with CT or TT genotype showed a significant greater percentage improvement of positive subscale PANSS scores than those with CC genotype ($p=0.031$).

Keywords: risperidone, *ABCB1*C3435T, p-glycoprotein, schizophrenia, pharmacogenomics

ความสัมพันธ์ของพอลิมอร์ฟิซึมของ *ABCB1* C3435T ผลทางคลินิกของ Risperidone ในผู้ป่วย Schizophrenia

วัชรดนัย ไตรสุวรรณ¹, ผดุงเกียรติ เขาวนกระแสนันธุ์², ณัฐพล โชคไมตรี², วนิตา รัตนสุมาวงศ์², รัชณี รอดศิริ¹, พรพิมล กิจสนาโยธิน¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²กองจิตเวชและประสาทวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ

P-glycoprotein (P-gp) พบได้ใน blood-brain barrier และมีบทบาทสำคัญในการปกป้องสมองจากการแพร่ผ่านของยา ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนว่าการมีพหุสัณฐาน *ABCB1*C3435T มีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษาด้วยยาริสเพอริโดนหรือไม่ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง *ABCB1*C3435T กับผลการรักษาทางคลินิกของริสเพอริโดนซึ่งประเมินโดย PANSS scores การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงสังเกตแบบไปข้างหน้าในผู้ป่วยโรคจิตเภท 50 รายจากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าซึ่งได้รับริสเพอริโดนเป็นยาเดี่ยวสำหรับรักษาอาการจิตเภท เก็บข้อมูลทางคลินิกและตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย จีโนมิกดีเอ็นเอจะถูกนำไปจีโนไทป์เพื่อหาความผันแปรของ *ABCB1*C3435T ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง *ABCB1*C3435T กับผลการรักษาของยาริสเพอริโดนหลังการรักษา 2 สัปดาห์ซึ่งแสดงโดย PANSS scores ด้วยสถิติ Student's t-test ของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระจากกัน ผลการศึกษาจีโนไทป์พบว่าผู้ป่วย 18 รายมีจีโนไทป์แบบ CC เป็นแบบ CT จำนวน 25 ราย และเป็นแบบ TT จำนวน 7 ราย โดยพบว่าการกระจายของจีโนไทป์อยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg การศึกษาความสัมพันธ์และพบว่า *ABCB1*C3435T มีความสัมพันธ์กับผลการรักษาทางคลินิกของผู้ป่วยจิตเภทโดยผู้ป่วยกลุ่มที่มีจีโนไทป์แบบ CT หรือ TT มีการลดลงของคะแนน PANSS ในหมวดอาการด้านบวกคิดเป็นร้อยละมากกว่ากลุ่ม CC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.031$)

คำสำคัญ: ริสเพอริโดน, เอบีซีบีวัน C3435T, พีไกลโคโปรตีน, โรคจิตเภท, เภสัชพันธุศาสตร์

Introduction

Schizophrenia is a mental illness characterized by hallucinations, delusions, disorganized speech, grossly disorganized behavior and negative symptoms. It is affected approximately one percent of the population(1). The etiology of schizophrenia remains unclear. It is hypothesized that the alterations of dopaminergic neurotransmission together with genetic vulnerability and stressful environment can lead to a disorder of thought, emotion, perception, and behaviors of schizophrenic patients.

Pharmacological management is the main approach in the treatment of schizophrenia. Two major groups of drugs used in schizophrenia are typical antipsychotics and atypical antipsychotics. Risperidone, an atypical antipsychotic, has been increasingly used because of its higher efficacy and lower incidence of extrapyramidal side effects than typical antipsychotics(2). In Thailand, risperidone is included in the National List of Essential Medicine 2004.

Risperidone has been shown to be a good substrate of P-glycoprotein (P-gp), a member of ATP-binding cassette (ABC) transporters(3). P-gp is an efflux transporter found abundantly in various tissue, e.g. epithelial tissue of the small and large intestines, biliary canaliculi of the hepatocyte, biliary ductules and proximal tubules of the kidneys (4). It is also found in capillaries of the blood-brain barrier and plays a role in limiting access of its substrates to the brain (5).

P-gp is encoded by *ABCB1* gene which is highly polymorphic. Many single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been found along the gene, from promoter to exon and intron (6). The frequencies of genetic variants differ in each ethnicity of population. A study of Hoffmeyer et al. reported that a synonymous SNP, *ABCB1* C3435T, was related to P-gp expression in the small intestine. According to the study, the TT genotype had two times lower P-gp expression in the small intestine than the CC genotype, and associated with a significantly higher plasma drug levels (6). Kimchi-Sarfaty et al. suggested that *ABCB1* C3435T might affect the specificity of P-gp to the substrate(7) leading to a number of subsequent studies to find out its impact on blood level of drug. However, the impact of *ABCB1* C3435T on the efficacy of drug treatment is still debatable. Retrospectively, Almoguera et al. found that *ABCB1*C3435T was associated with increased efficacy of risperidone (8) whereas Xing et al. found no impact of *ABCB1*C3435T on risperidone treatment(9). Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of *ABCB1*C3435T on risperidone treatment outcomes prospectively.

Materials and Methods

Study participants and drug treatment: This study was an observational prospective study. The participants were patients with schizophrenia, admitting at Phramongkutklao Hospital during 2015-2016, whose symptoms met the criteria of the Fourth Edition of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)(10) and receiving risperidone as antipsychotic monotherapy without using cytochrome P450 (CYP)inhibitors, P-gp inducers or inhibitors. The daily dose of drug was adjusted according to responses of each patient.

Clinical Assessment: Demographic data i.e. weight, height, smoking history, and drinking history was recorded. Baseline clinical data i.e. the Clinical Global Impressions Scale(CGI) and the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) scores were evaluated by psychiatrist at pre-treatment. These scores were evaluated again two weeks after risperidone treatment.

Treatment outcome assessments include PANSS total and subscale (positive symptoms and negative symptoms) scores were calculated as the percentage of improvement as follows:(11)

$$\% \text{ improvement} = (\text{PANSS}_{\text{baseline}} - \text{PANSS}_{\text{end}}) / (\text{PANSS}_{\text{baseline}} - \text{PANSS}_{\text{baseline minimum}}) \times 100$$

Genotyping: Peripheral blood samples were collected from each patient. Genomic DNA was extracted from leukocyte by using QIAGEN DNA purification kit. *ABCB1* C3435T was genotyped by using Taqman[®] SNP Genotyping Assays.

The study was approved by the institutional review board of The Royal Thai Army Medical Department (Q012h/58). The written informed consent was obtained from each participant.

Statistical Analysis:The association of *ABCB1* C3435T with initial efficacy of risperidone was determined by independent sample Student's *t*-test, with a statistical significant at p-value of <0.05. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

This observational prospective study was conducted on the total of 50 patients with schizophrenia receiving risperidone monotherapy at Phramongkutklao Hospital during 2015-2016. Fourty six of them were males aged 28.24±9.66 years and the other four were females aged 48.88±15.70 years. The patients received

5.06±1.41mg of risperidone per day and stayed in the hospital for 38.64±16.77 days. Demographic and clinical characteristics of the patients are shown in Table 1.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of all patients enrolled in the study

Clinical and demographic data	*(mean±SD),(range)
Number of patients	N=50
Gender	
Male	46 (92.00%)
Female	4 (8.00%)
Age years*	29.89±11.52 (19.92-63.00)
Body weight*	63.51±9.79 (46.50-92.30)
Height*	168.11±7.53 (148.00-184.00)
BMI*	22.61±4.15 (15.90-42.14)
Duration of illness,(years)*	3.77±6.21 (0.04-30.00)
Dosage of risperidone 2 weeks treatment*	5.06±1.41 (2.00-8.00)
Hospital stay,(day)*	38.64±16.77 (16.00-79.00)
Education	
Primary school	8 (16.00%)
High school	34 (68.00%)
College	8 (16.00%)
Smokers	
Never	17 (34.00%)
Sometimes	3 (6.00%)
Often	30 (60.00%)
Schizophrenia	
Paranoid	25 (50.00%)
Disorganized	1 (2.00%)
Undifferentiated	2 (4.00%)
Unspecified	22 (44.00%)

In terms of clinical symptoms, **initially**, patients had average PANSS total score of 94.24±21.25. PANSS total score **was** decreased to 65.32±21.19 **after** two weeks of risperidone treatment, or having improvement of 30.55±15.16%. Initial positive subscale PANSS score of the patients was 26.14±7.23 and **was** reduced to 16.6±5.72 **after** two weeks **of** the treatment, or improvement of 34.28±21.5%. In addition, baseline negative subscale PANSS score of the patients (23.58±6.77) **was** also reduced to 16.54±6.09 after two weeks of the treatment, or an improvement of 28.57±19.78%. The differences of the scores before and after risperidone treatment were statistical significant, as shown in Table 2.

Table 2 Clinical improvement presented by PANSS total and PANSS subscale in all patients

Variables	Mean±SD	p-value
PANSS Positive		
Baseline PANSS score	26.14±7.23	
2 week PANSS score	16.6±5.72	<0.001
Percentage of change in PANSS Positive score	34.28±21.57	
PANSS Negative		
Baseline PANSS score	23.58±6.77	
2 week PANSS score	16.54±6.09	<0.001
Percentage of change in PANSS Negative score	28.57±19.78	
PANSS Total		
Baseline PANSS score	94.24±21.25	
2 week PANSS score	65.32±21.19	<0.001
Percentage of change in PANSS Total score	30.55±15.16	

p-value were determined by Student's *t*-test

In terms of prevalence of *ABCB1* C3435T, the distribution of the *ABCB1* C3435T was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). The variant allele frequency (T allele) was 39%. (Table 3).

Table 3 *ABCB1* C3435T genotype distribution and allele frequencies in all patients

Genotype	N(%)	Allele Frequency (%)	Hardy-Weinberg equilibrium p-value
<i>ABCB1</i> C3435T			
CC	18 (36.0)	C=61 (61.0)	0.7191
CT	25 (50.0)	T=39 (39.0)	
TT	7 (14.0)		

To determine the association of *ABCB1*C3435T with risperidone treatment outcome, PANSS total and subscale (positive symptoms and negative symptoms) scores were compared between patients who carry CC genotype and those carrying variant allele (CT or TT genotypes). The result showed that after receiving risperidone for two weeks, the patients in the C3435T variant group had significant greater percentage improvement of positive subscale PANSS score than the homozygous

wild type group ($p = 0.031$). However, no significant association was seen for negative subscale PANSS and PANSS total scores.(Table 4).

Table 4. The association of *ABCB1*C3435T genotype on PANSS total and PANSS subscale scores.

Variables	Baseline PANSS score		% improvement in PANSS score	
	Mean±SD	<i>p</i> -value	Mean±SD	<i>p</i> -value
PANSS Positive				
CC	24.89±6.38		25.60±25.56	
CT+TT	26.84±7.68	0.364	39.16±17.57	0.031
PANSS Negative				
CC	23.50±6.27		26.12±20.63	
CT+TT	23.63±7.14	0.951	29.94±19.49	0.518
PANSS Total				
CC	92.61±18.47		27.13±15.00	
CT+TT	95.16±22.89	0.689	32.48±15.13	0.235

p-value were determined by Student's *t*-test

Discussion

As an atypical antipsychotic, risperidone antagonizes dopamine D₂ receptor and 5-HT_{2A} receptors in the mesolimbic and mesocortical dopaminergic pathway of the brain leading to antipsychotic action(12). Risperidone has high volume of distribution and it can distribute to the brain by lipid diffusion(13, 14). However, risperidone and its active metabolite can be effluxed by P-gp as the protection mechanism against toxic xenobiotic(15).

The present study showed the association between *ABCB1*C3435T variant with greater improvement in positive subscale PANSS scores after risperidone treatment. Positive subscale PANSS scores of the patients with CT or TT genotype was decreased in a greater extent than that of the homozygous wild type. Previously, *ABCB1*C3435T variant has been shown to impact risperidone blood level(16). In addition, risperidone blood level correlated with dopamine D₂/D₃ receptor occupancy in the striatum(17). Thus, the present study support those findings that patients with *ABCB1* CT or TT genotypes may be associated with increased level of risperidone in blood or brain and subsequently increased response to risperidone as shown by the greater improvement of positive subscale PANSS scores.

While Almoguera et al. (8) reported the association between CT+TT C3435T variant with total PANSS scores, no significant association between *ABCB1*C3435T with total PANSS scores was observed in this study. Duration of treatment might affect total PANSS scores. Almoguera et al. (8) evaluated PANSS

scores at baseline and discharge while this study monitored PANSS scores at baseline and 2-week after treatment, thus, only improvement of positive subscale PANSS scores was observed in this study. Risperidone has high dopamine D₂ receptor occupancy compared to other atypical antipsychotics (18) which might lead to the higher efficacy in the treatment of positive symptoms. Moreover, meta-analysis study revealed the significant reduction of total and positive subscale PANSS scores but not negative subscale PANSS scores at 6-week after risperidone treatment (19). This might explain the lack of risperidone effect in negative subscale PANSS score evaluated 2-week after treatment.

In contrast to this study, previous retrospective study by Xing et al. showed no association between C3435T variant and risperidone treatment (9). Dose adjustment and additive treatment usually occurred in retrospective study, therefore, the impact of genetic factors could be masked. On the other hand, the present study performed prospectively with monotherapy of risperidone. The clinical outcomes practically evaluate at 2-week after treatment to determine dose adjustment. Thus, the clinical outcome observed in this study certainly represent the effect of risperidone.

Conclusion

The present study demonstrated the association of *ABCBI*C3435T variant with greater effect in positive subscale PANSS scores in Thai patients with schizophrenia. Our findings suggest that the variant of *ABCBI* might influence the response to risperidone treatment and support the theory that P-gp had impact on the efficacy of antipsychotic drug treatment. Further studies are needed, together with meta-analysis to create knowledge for using genetic marker as a decision tool for treating patients in the future.

Acknowledgements

This study was supported by the 90th anniversary of Chulalongkorn University fund (GCUGR1125582029M No 24).

References

1. van Veelen NM, Sommer IE. PSYCHOSIS IN PSYCHIATRIC DISORDERS. The Assessment of Psychosis: A Reference Book and Rating Scales for Research and Practice. 2014:102.
2. Davies A, Adena MA, Keks NA, Catts SV, Lambert T, Schweitzer I. Risperidone versus haloperidol: I. Meta-analysis of efficacy and safety. *Clinical therapeutics*. 1998;20(1):58-71.
3. Boulton DW, DeVane CL, Liston HL, Markowitz JS. In vitro P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. *Life sciences*. 2002;71(2):163-9.

4. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2004 Jan;75(1):13-33. PubMed PMID: 14749689.
5. Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advanced drug delivery reviews*. 1999 Apr 5;36(2-3):179-94. PubMed PMID: 10837715.
6. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Mar 28;97(7):3473-8. PubMed PMID: 10716719. Pubmed Central PMCID: 16264.
7. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I-W, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007;315(5811):525-8.
8. Almoguera B, Riveiro-Alvarez R, Lopez-Castroman J, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, Fernandez-Piqueras J, et al. CYP2D6 poor metabolizer status might be associated with better response to risperidone treatment. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;23(11):627-30.
9. Xing Q, Gao R, Li H, Feng G, Xu M, Duan S, et al. Polymorphisms of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients. *Pharmacogenomics*. 2006;7(7):987-93.
10. American Psychiatric Association, Association AP. *Diagnostic and statistical manual-text revision (DSM-IV-TRim, 2000)*. American Psychiatric Association; 2000.
11. Obermeier M. *The Positive and Negative Syndrome Scale for Schizophrenia: An Established Rating Instrument in Need of Clarification*. Citeseer; 2012.
12. Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. 1996;153(4):466-76.
13. Kelder J, Grootenhuis PD, Bayada DM, Delbressine LP, Ploemen J-P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharmaceutical research*. 1999;16(10):1514-9.
14. Wang J-S, Ruan Y, Taylor RM, Donovan JL, Markowitz JS, DeVane CL. The brain entry of risperidone and 9-hydroxyrisperidone is greatly limited by P-glycoprotein. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2004;7(4):415-9.
15. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in pharmacological sciences*. 2004;25(8):423-9.
16. Gunes A, Spina E, Dahl M-L, Scordo MG. ABCB1 polymorphisms influence steady-state plasma levels of 9-hydroxyrisperidone and risperidone active moiety. *Therapeutic drug monitoring*. 2008;30(5):628-33.
17. Nakajima S, Uchida H, Bies RR, Caravaggio F, Suzuki T, Plitman E, et al. Dopamine D2/3 receptor occupancy following dose reduction is predictable with minimal plasma antipsychotic concentrations: an open-label clinical trial. *Schizophrenia bulletin*. 2015.sbv106.
18. Kapur S, Zipursky RB, Remington G. Clinical and theoretical implications of 5-HT₂ and D₂ receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1999;156(2):286-93.
19. Harvey RC, James AC, Shields GE. A Systematic Review and Network Meta-Analysis to Assess the Relative Efficacy of Antipsychotics for the Treatment of Positive and Negative Symptoms in Early-Onset Schizophrenia. *CNS Drugs* 2016;30(1):27-39.

B23**Association of Phenytoin Maintenance Dose and Severe Cutaneous Adverse Drug Reactions in Thai Patients**

**Kittika Yampayon¹, Chonlaphat Sukasem^{2,3}, Chanin Limwongse⁴,
Yotin Chinvarun⁵, Therdpong Tempark⁶, Ticha Rerkpattanapipat⁷,
Pornpimol Kijsanayotin¹**

¹*Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

²*Division of Pharmacogenetics and Personalized Medicine, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

³*Laboratory for Pharmacogenomics, SomdechPhraDebaratana Medical Center (SDMC), Ramathibodi Hospital, Bangkok, Thailand*

⁴*Division of Medical Genetics, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

⁵*Neurology Unit, Department of Internal Medicine, Phramongkutklao Hospital, Bangkok, Thailand*

⁶*Division of Dermatology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

⁷*Division of Allergy Immunology and Rheumatology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Abstract

Phenytoin (PHT) is one of the most cost-effective antiepileptic drugs and also the common cause of severe cutaneous adverse drug reactions (SCARs). The Previous studies showed that doses of phenytoin had an effect on drug levels and high serum phenytoin levels appeared to be a risk factor for drug-induced skin reactions. Thus, this study aimed to investigate the association between doses of phenytoin and phenotype specific PHT-induced SCARs in Thai patients. Thirty-six PHT-induced SCARs cases (15 SJS and 21 DRESS/DHS) and 100 PHT-tolerant controls were studied. The associations of loading and maintenance doses of phenytoin with SCARs were tested. The results showed that means of phenytoin maintenance doses based on body weight in the SCARs cases (mean \pm SD, 5.45 ± 1.28 mg/kg/day), specifically DRESS/DHS (5.71 ± 1.26 mg/kg/day) were significantly higher than that in the tolerant controls (4.64 ± 1.36 mg/kg/day) ($p=0.002$ and 0.001 , respectively). Using phenytoin maintenance dose higher than 5 mg/kg/day was associated with PHT-induced SCARs and DRESS/DHS ($p = 0.032$, OR = 2.38 and $p = 0.007$, OR = 4.26, respectively). However, there was no association between dose of phenytoin and PHT-induced SJS. In conclusion, the association between maintenance dose of

phenytoin and PHT-induced SCARs was first observed in this study. Using the higher maintenance dose of phenytoin per body weight might increase the risk of PHT-induced SCARs, especially DRESS.

Keywords: Phenytoin, SCARs, DRESS/DHS, SJS, Dose, Non-genetic factor

ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยด์ที่ใช้ควบคุมอาการกับการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรงในผู้ป่วยชาวไทย

กฤติกา แยมพยนต์¹, ชลภัทรสุขเกษม^{2,3}, ชนินทร์ลิ้มวงษ์⁴, โยธินชินวาลัญษ์⁵,
เทอดพงศ์เต็มภาคย์⁶, ทิชาฤกษ์พัฒนาพิพัฒน์⁷, พรพิมลกิจสนาโยธิน¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²สาขาวิชาพยาธิวิทยาคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

³ห้องปฏิบัติการเภสัชพันธุศาสตร์และการรักษาเฉพาะบุคคล ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตน์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

⁴สาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล

⁵หน่วยประสาทวิทยากองอายุรกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

⁶หน่วยโรคตจวิทยาภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

⁷สาขาวิชาโรคภูมิแพ้ อิมมูโนวิทยาและโรคข้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีมหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

เฟนิทอยด์ เป็นยากันชักที่มีประสิทธิภาพและมีความคุ้มค่าด้านต้นทุนประสิทธิผลแต่ขณะเดียวกันก็เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรง การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าขนาดยาเฟนิทอยด์ที่ได้รับมีผลต่อระดับยาในเลือดและการมีระดับยาเฟนิทอยด์ในเลือดสูงอาจจะเป็นปัจจัยเสี่ยงอย่างหนึ่งของการเกิดผื่นแพ้ยาเฟนิทอยด์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยด์ที่ได้รับกับการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรงในแต่ละรูปแบบจากยาเฟนิทอยด์ในผู้ป่วยชาวไทย โดยมีผู้ป่วยในกลุ่มที่เกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรงจากยาเฟนิทอยด์จำนวน 36 คน (เป็นผู้ที่เกิดผื่นชนิด SJS 15 คน และผื่นชนิด DRESS/DHS 21 คน) และผู้ป่วยกลุ่มควบคุมซึ่งไม่แพ้ยาเฟนิทอยด์จำนวน 100 คน ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยด์เริ่มต้นและขนาดยาเฟนิทอยด์ที่ใช้ควบคุมอาการกับการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรง จากการศึกษพบว่าขนาดยาต่อน้ำหนักตัวของยาเฟนิทอยด์ที่ใช้ควบคุมอาการในกลุ่มผู้ป่วยที่เกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรง (5.45 ± 1.28 มก./กก./วัน) โดยเฉพาะกลุ่มที่เกิดผื่นชนิด DRESS/DHS (5.71 ± 1.26 มก./กก./วัน) มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าในกลุ่มควบคุม (4.64 ± 1.36 มก./กก./วัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.002$ และ 0.001 ตามลำดับ) และพบว่าการใช้ยาเฟนิทอยด์ขนาดสูงกว่า 5 มก./กก./วัน ในการรักษาเพื่อควบคุมอาการมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรงและการเกิดผื่นชนิด DRESS/DHS ($p = 0.032$, OR =

2.38 และ $p = 0.007$, $OR = 4.26$ ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยด์ที่ใช้กับการเกิดผื่นชนิด SJS การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างขนาดยาเฟนิทอยด์ที่ใช้ควบคุมอาการกับการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรงจากยาเฟนิทอยด์ โดยพบว่าขนาดยาต่อน้ำหนักตัวของยาเฟนิทอยด์ที่สูงขึ้นในการรักษาเพื่อควบคุมอาการอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดผื่นแพ้ยาชนิดรุนแรงจากเฟนิทอยด์ โดยเฉพาะการเกิดผื่นชนิด DRESS/DHS

คำสำคัญ: ยาเฟนิทอยด์, อาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังชนิดรุนแรง, DRESS/DHS, ผื่นชนิด SJS, ขนาดยาต่อน้ำหนักตัว

Introduction

Phenytoin (PHT) is not only a widely used antiepileptic drug for seizure control and prevention but also a common cause of severe cutaneous adverse drug reactions (SCARs), including drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS), drug hypersensitivity syndrome (DHS), Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN).¹⁻³ The incidences of SCARs due to phenytoin were ranging from 0.2 to 2.4 per 1,000 users, depending on types of rash and ethnic groups.^{4,6} In Thailand, according to the data from a cumulative spontaneous reports of adverse drug reactions between 1984 and 2014, phenytoin was reported as the number one of drug causing DRESS/DHS (233 cases) and a top five of drug causing SJS/TEN (1,104 cases).⁷ Accordingly, PHT-induced SCARs is an important problem in medical treatment.

Several factors associated with drug eruptions were studied. In addition to immunologic risk factors such as *HLA* alleles, the influential effects of doses on drug-induced cutaneous adverse reactions have been investigated. For lamotrigine, the starting doses and titration rates were possibly related to the incidence of serious rash.^{8,9} Moreover, high starting dose of allopurinol was a risk factor for allopurinol hypersensitivity syndrome.^{10,11}

For phenytoin, in 1978 and 1984, the evidences suggested that high serum phenytoin levels were associated with the occurrences of PHT-induced skin reactions.^{12,13} Furthermore, a poor-metabolizing variant, *CYP2C9*3*, was recently reported as a significant risk factor for PHT-induced SCARs in many Asian countries, including Thailand.^{4,14} There were prior studies showing that phenytoin levels were increased in *CYP2C9*3* carriers and would be risen depending on doses of phenytoin administered.¹⁵⁻¹⁷ Based on the evidences mentioned above, it is possible that factors affecting drug metabolisms or phenytoin levels, such as doses, may be associated with PHT-induced SCARs.^{10,11} Consequently, this study aimed to investigate the association between doses of phenytoin and phenotype specific PHT-induced SCARs in Thai patients.

Materials and Methods

Cases and controls

This study recruited patients from three medical school hospitals in Bangkok, Thailand, including Siriraj hospital, Ramathibodi hospital and Phramongkutklao hospital. Thai adult patients with phenytoin use found in medical records between January 2008 and June 2015 were eligible. Thirty-six patients who developed SJS/TEN or DRESS/DHS from phenytoin within 3 months after phenytoin exposure were defined as SCARs cases. One hundred patients without any cutaneous adverse reactions and had taken phenytoin for at least 3 months were defined as PHT-tolerant

controls. The participants' demographic data, clinical manifestation of ADR, drug level, and dosage of phenytoin used were reviewed from their medical records.

Phenytoin has been identified as the principle cause of skin lesions in all 36 patient cases according to Naranjo algorithm.¹⁸ All SCARs cases were further confirmed by the same dermatologist using consensus diagnostic and phenotyping criteria. Based on Roujeau criteria,¹⁹ SJS and TEN were characterized as rapidly developing dusky purpuric macules, atypical target-like lesions or blisters accompanied by mucosal involvement with skin detachment. Distinct cases of SJS, SJS-TEN overlap, and TEN were differentiated based on the extent of skin area detachment ranging from less than 10% of the body surface area (BSA), 10 to 30% BSA, and greater than 30% BSA, respectively.¹⁹ DRESS and DHS were assessed using RegiSCAR criteria which consisted of acute skin rash together with the involvement of at least one internal organ (e.g., hepatitis and nephritis), lymphadenopathy, hematologic abnormality (e.g., eosinophilia, and atypical lymphocytosis) and fever,²⁰ or according to the triad of fever, rash and internal organ involvement.⁵

This study was approved by the institutional review board of each hospital, specifically, Siriraj Institutional Review Board (471/2557 EC1), Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital (ID 05-58-17) and Institutional Review Board of The Royal Thai Army Medical Department (Q017h/57). The written informed consent was obtained from each participant.

Statistical analysis

The normally distributed data were presented as mean \pm standard deviation (SD) and analyzed using Student's t-tests. For data that were not normally distributed were presented as median value with range, and were analyzed using Mann-Whitney U tests. Normal distributions of continuous data were examined using Kolmogorov-Smirnov test or Shapiro-Wilk test. Proportion data were compared using Fisher's exact tests. Odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) were reported. For a zero in any cells of a contingency table, Haldane's modification, adding 0.5 to all cells of a 2×2 table, was applied to estimate the odds ratio (OR).²¹ All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Two-tailed p-value < 0.05 was considered statistically significant. The figures were plotted using GraphPad Prism version 7.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Table 1. Demographic data of PHT-induced SCARs cases and PHT-tolerant controls

Characteristics	Cases of PHT-induced SCARs			PHT-Tolerant Controls (n=100)	p-value
	SJS (n=15)	DRESS/DHS (n=21)	Total SCARs (n=36)		
Gender, No.(%)					
Female	9 (60.0)	13 (61.9)	22 (61.1)	64 (64.0)	0.841 ^{a,b}
Male	6 (40.0)	8 (38.1)	14 (38.9)	36 (36.0)	
Age, years					
Mean ± SD	57.9 ±12.7	49.2 ±19.0	52.9 ±17.0	49.0 ±12.3	0.218 ^{a,c}
PHT exposure, days					
Duration, Median (Range)	26 (7-65)	25 (8-51)	26 (7-65)	1008 (91-8972)	<0.001 ^{a,d}
Onset of ADR, Median (Range)	21 (7-61)	23 (8-48)	22 (7-61)	-	-

^a PHT-induced SCARs cases and PHT-tolerant controls were compared

^b p-value were calculated by Fisher's exact test (two-tailed)

^c p-value were calculated by Student's t-test

^d p-value were calculated by Mann-Whitney U test

Table 2. Total dose of phenytoin in PHT-induced SCARs cases and PHT-tolerant controls

Groups or subgroups	n	Total dose of PHT			p-value ^{a,b}
		Median	Minimum	Maximum	
<i>Loading dose (mg)</i>					
SCARs	20	750	500	1,000	0.677
SJS	6	750	500	800	0.324
DRESS/DHS	14	750	700	1,000	0.905
Tolerant control	34	750	500	1,250	
<i>Maintenance dose (mg/day)</i>					
SCARs	36	300	200	300	0.666
SJS	15	300	200	300	0.915
DRESS/DHS	21	300	200	300	0.619
Tolerant control	100	300	100	400	

^a Median dose of PHT in PHT-induced SCARs, SJS or DRESS/DHS cases were compared with PHT-tolerant controls

^b p-value were calculated by Mann-Whitney U test

Table 3. Associations between doses of phenytoin based on body weight and PHT-induced SCARs

Dose of PHT based on BW	Groups or subgroups (Participant number; n)	Positive participants n (%)	<i>p</i> -value ^{a,b}	OR	(95% CI)
<i>Loading dose</i>					
> 15 mg/kg	SCARs (20)	8 (40.0)	0.552	1.60	(0.50-5.10)
	SJS (6)	0 (0)	0.307	0.18	(0.01-3.48)
	DRESS/DHS (14)	8 (57.1)	0.103	3.20	(0.88-11.63)
	Tolerant control (34)	10 (29.4)			
> 20 mg/kg	SCARs (20)	2 (10.0)	0.548	3.67	(0.31-43.27)
	SJS (6)	0 (0)	1.000	1.72	(0.06-47.00)
	DRESS/DHS (14)	2 (14.3)	0.200	5.50	(0.46-66.32)
	Tolerant control (34)	1 (2.9)			
<i>Maintenance dose</i>					
> 5 mg/kg/day	SCARs (36)	21 (58.3)	0.032*	2.38	(1.10-5.19)
	SJS (15)	6 (40.0)	1.000	1.14	(0.37-3.44)
	DRESS/DHS (21)	15 (71.4)	0.007*	4.26	(1.52-11.93)
	Tolerant control (100)	37 (37.0)			
> 7 mg/kg/day	SCARs (36)	5 (13.9)	0.014*	7.90	(1.46-42.78)
	SJS (15)	2 (13.3)	0.082	7.54	(0.98-58.18)
	DRESS/DHS (21)	3 (14.3)	0.036*	8.17	(1.27-52.38)
	Tolerant control (100)	2 (2.0)			

^a PHT-induced SCARs, SJS or DRESS/DHS cases were compared with PHT-tolerant controls

^b *p*-value were calculated by Fisher's exact test (two-tailed)

* Significant difference at *p*-value < 0.05

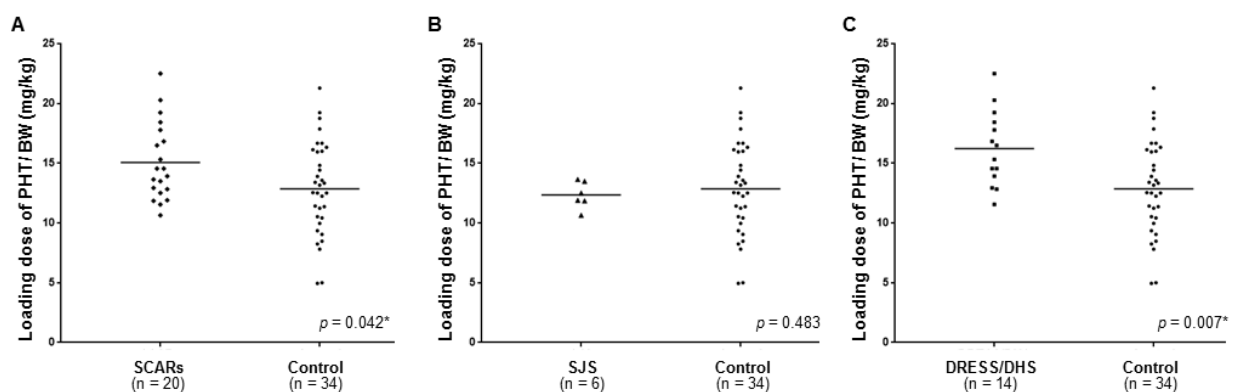


Figure 1. Scatter dot plots of loading dose of phenytoin based on body weight. Each group of (A) PHT-induced SCARs, (B) PHT-induced SJS, and (C) PHT-induced DRESS/DHS was compared with PHT-tolerant controls. The horizontal lines refer to mean loading doses of phenytoin. *p*-value were calculated by Student's *t*-test. * Significant difference at *p*-value < 0.05.

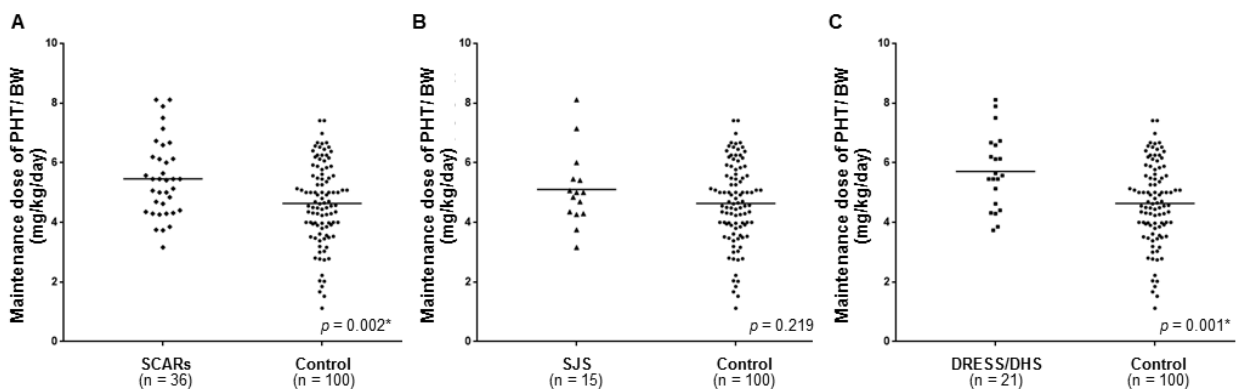


Figure 2. Scatter dot plots of maintenance dose of phenytoin based on body weight. Each group of (A) PHT-induced SCARs, (B) PHT-induced SJS, and (C) PHT-induced DRESS/DHS was compared with PHT-tolerant controls. The horizontal lines refer to mean maintenance doses of phenytoin. *p*-value were calculated by Student's *t*-test. *Significant difference at *p*-value < 0.05.

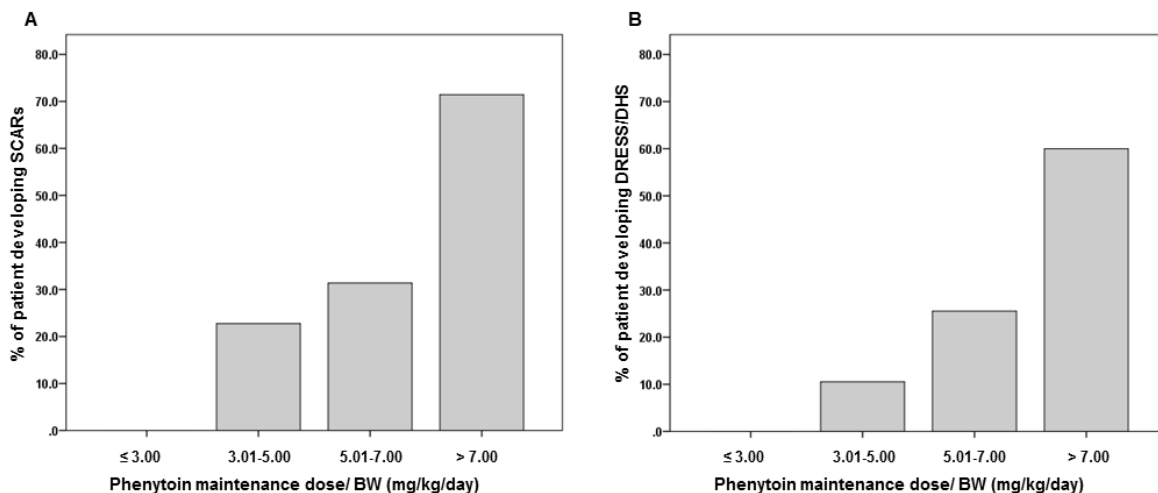


Figure 3. Percentage of patients who developed (A) SCARs and (B) DRESS/DHS from phenytoin in each range of phenytoin maintenance dose based on body weight (BW).

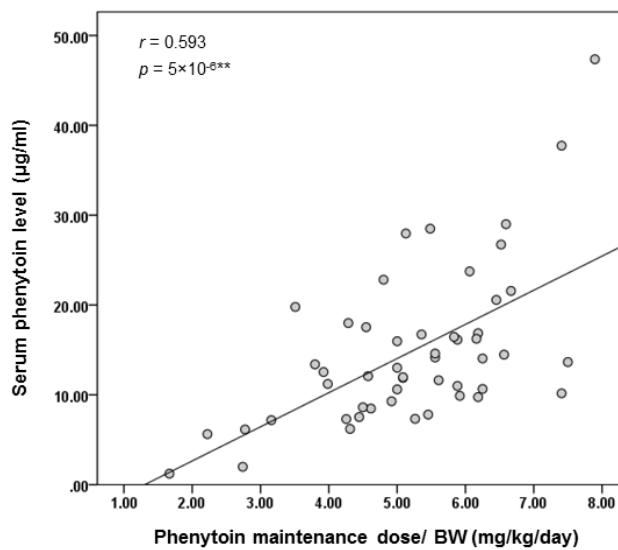


Figure 4. Correlation between serum phenytoin level and phenytoin maintenance dose based on body weight (BW). r refer to Pearson correlation coefficient. ** Correlation is significant at the <0.001 level (two-tailed).

Results

Demographic data of patients

The demographic data of 36 PHT-induced SCARs (15 SJS and 21 DRESS/DHS) and 100 PHT-tolerant controls are summarized in Table 1. There were no differences in gender and age between SCARs cases and tolerant controls ($p = 0.841$ and 0.218 , respectively). The median onset of PHT-induced SCARs was 22 days.

Association between loading dose of phenytoin and PHT-induced SCARs

The data of phenytoin loading doses were available in 20 PHT-induced SCARs cases and 34 PHT-tolerant controls. The median total loading doses of phenytoin were 750 mg, equally in all groups. There were no differences between SCAR, SJS or DRESS/DHS cases and tolerant controls ($p = 0.677$, 0.324 and 0.905 , respectively) (Table 2).

However, the phenytoin loading dose based on body weight in the SCARs cases was significantly higher than that in the tolerant controls ($p = 0.042$). Their loading doses were 15.06 ± 3.23 (mean \pm SD) and 12.91 ± 3.87 mg/kg, respectively (Figure 1A). Moreover, in the specific phenotype analysis, an average loading dose of phenytoin based on body weight in the DRESS/DHS subgroup (16.22 ± 3.15 mg/kg) was statistically significant higher than that in the tolerant control group, ($p =$

0.007) (Figure 1C). **In contrast**, for SJS subgroup, the phenytoin loading doses per body weight (12.33 ± 1.13 mg/kg) did not significantly differ from **that in** tolerant controls ($p = 0.483$) (Figure 1B).

Based on the usual loading dose, the proportions of patients who were started on phenytoin with a loading dose greater than 15 and 20 mg/kg were found more frequently in the SCARs cases than in the tolerant controls, specifically in DRESS/DHS subgroup. However, the statistically significant associations between higher loading doses of phenytoin and PHT-induced SCARs were not observed (Table 3).

Association between maintenance dose of phenytoin and PHT-induced SCARs

Although the total daily maintenance dose of phenytoin in the SCARs cases, including SJS and DRESS/DHS subgroups, and the tolerant controls were 300 mg/day, equally in all groups (Table 2), the maintenance doses based on their body weight were different. The maintenance dose of phenytoin per body weight in the SCAR cases was statistically significant higher than that in the tolerant controls (mean \pm SD, 5.45 ± 1.28 vs 4.64 ± 1.36 mg/kg/day, $p = 0.002$) (Figure 2A). A significantly higher phenytoin maintenance dose was observed in the DRESS/DHS subgroup (5.71 ± 1.26 mg/kg/day), but not in the SJS subgroup (5.10 ± 1.25 mg/kg/day), when those were compared with the tolerant control group ($p = 0.001$ and 0.219 , respectively) (Figure 2B and 2C).

Furthermore, the results showed that using phenytoin maintenance dose higher than 5 mg/kg/day was associated with PHT-induced SCARs ($p = 0.032$, OR = 2.38), **specifically** for DRESS/DHS phenotype ($p = 0.007$, OR = 4.26) (Table 3). In addition, the percentages and the risks of developing SCARs and DRESS/DHS were increased in patients taking a higher maintenance dose of phenytoin (Fig 3A and 3B, Table 3). The odds ratios of PHT-induced SCARs and DRESS/DHS were increased to approximately 8 in patients who using phenytoin maintenance dose greater than 7 mg/kg/day (Table 3).

Discussion

Phenytoin is an antiepileptic drug with a narrow therapeutic index. The total serum phenytoin levels in the range of 10-20 μ g/ml (1-2 μ g/ml of unbound phenytoin) are associated with achieving therapeutic effects without toxicity.^{22, 23} The recommended doses are slightly higher in the younger age groups and initially lower in the geriatric groups. For adults, the usual maintenance doses of phenytoin are 300-400 mg/day, which may be increased to 600 mg/day, or approximately 5-7 mg/kg/day.^{23, 24} The loading doses of phenytoin are generally 10-20 mg/kg and as much as 30 mg/kg in some patients.^{23, 25} Based on usual dose per body weight, while almost all PHT-tolerant controls received phenytoin within the recommended dose

range, about 10-14% of patients with SCARs got the higher doses (loading doses > 20 mg/kg or maintenance doses > 7 mg/kg/day).

The signs and symptoms such as ataxia, nystagmus, slurred speech, nausea, vomiting, and drowsiness are already known adverse effects of phenytoin, which are related to doses and drug concentrations.^{22, 26} In addition to those side effects, this study showed that allergic reactions to phenytoin such as SCARs and DRESS/DHS were associated with daily phenytoin maintenance doses based on body weight. Moreover, we found that the risks of PHT-induced SCARs, especially DRESS/DHS, were increased when the higher maintenance doses of phenytoin were used. According to this finding, it is likely that that developing SCARs and DRESS/DHS from phenytoin could possibly be related to the higher drug levels. This suggestion is supported by the significant correlation between serum phenytoin levels and daily phenytoin maintenance doses per body weight (Figure 4). An increased daily dose of phenytoin resulted in a rise of serum phenytoin levels. In addition, our results are in line with the previous finding that *CYP2C9*3* variant was an associated risk factor of PHT-induced SCARs.^{4, 14} It may suggest that the influence of using a higher maintenance dose of phenytoin may be similar to the effect of a poor-metabolizing variant, *CYP2C9*3*, on serum phenytoin levels.^{16, 17} However, there was no association between the higher loading doses of phenytoin and PHT-induced SCARs. This could possibly be resulted from the phenytoin loading dose had been discontinued and changed to the maintenance dose before the time to steady state level of phenytoin.

For further studies, the associations between doses of phenytoin and PHT-induced SCARs, including the correlation of serum phenytoin levels, should be confirmed in other populations. The studies may be extended to minor reactions, such as PHT-induced maculopapular eruptions (MPE). The associations of PHT-induced SCARs with other non-genetic factors that possibly affect phenytoin levels, such as renal functions, liver functions, and drug interactions, should also be investigated.

Conclusion

The association between maintenance dose of phenytoin and PHT-induced SCARs was first observed in this study. Using the higher maintenance dose of phenytoin per body weight might increase the risk of PHT-induced SCARs, especially DRESS.

Acknowledgements

This study was supported by the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund and the 90th anniversary of Chulalongkorn University fund (GCUCR1125572100M No.86). The authors would like to thank all patients for participating in this study.

References

1. Roujeau JC, Stern RS. Severe Adverse Cutaneous Reactions to Drugs. *N Engl J Med* 1994;331:1272-1285.
2. Mockenhaupt M, Viboud C, Dunant A, et al. Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis: Assessment of Medication Risks with Emphasis on Recently Marketed Drugs. The EuroSCAR-Study. *J Invest Dermatol* 2007;128:35-44.
3. Roujeau J-C, Allanore L, Liss Y, et al. Severe Cutaneous Adverse Reactions to Drugs (SCAR): Definitions, Diagnostic Criteria, Genetic Predisposition. *Dermatol Sinica* 2009;27:203-209.
4. Chung W, Chang W, Lee Y, et al. Genetic variants associated with phenytoin-related severe cutaneous adverse reactions. *JAMA* 2014;312:525-534.
5. Knowles SR, Shapiro LE, Shear NH. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: incidence, prevention and management. *Drug Saf* 1999;21:489-501.
6. Mockenhaupt M, Messenheimer J, Tennis P, et al. Risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in new users of antiepileptics. *Neurology* 2005;64:1134-1138.
7. Health Product Vigilance Center (HPVC). Spontaneous reports of adverse drug reaction 2014. Bangkok: Aksorn graphic and design; 2014.
8. Guberman AH, Besag FM, Brodie MJ, et al. Lamotrigine-associated rash: risk/benefit considerations in adults and children. *Epilepsia* 1999;40:985-991.
9. Wong IC, Mawer GE, Sander JW. Factors influencing the incidence of lamotrigine-related skin rash. *Ann Pharmacother* 1999;33:1037-1042.
10. Stamp LK, Taylor WJ, Jones PB, et al. Starting dose is a risk factor for allopurinol hypersensitivity syndrome: A proposed safe starting dose of allopurinol. *Arthritis & Rheumatism* 2012;64:2529-2536.
11. Wang CW, Dao RL, Chung WH. Immunopathogenesis and risk factors for allopurinol severe cutaneous adverse reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016;16:339-345.

12. Wilson JT, Hojer B, Tomson G, et al. High incidence of a concentration-dependent skin reaction in children treated with phenytoin. *Br Med J* 1978;1:1583-1586.
13. Chadwick D, Shaw MD, Foy P, et al. Serum anticonvulsant concentrations and the risk of drug induced skin eruptions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1984;47:642-644.
14. Suvichapanich S, Jittikoon J, Wichukchinda N, et al. Association analysis of CYP2C9*3 and phenytoin-induced severe cutaneous adverse reactions (SCARs) in Thai epilepsy children. *J Hum Genet* 2015;60:413-417.
15. Bochner F, Hooper WD, Tyrer JH, et al. Effect of dosage increments on blood phenytoin concentrations. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1972;35:873-876.
16. Insaro M, Chinvarun Y, Yodnopkloa P, et al. Association of *CYP2C9*, *CYP2C19* genetic variants and non-genetic variants with phenytoin blood concentration in Thai epileptic patients. *Thai J Pharmacol* 2011;33:58-64.
17. Hung CC, Huang HC, Gao YH, et al. Effects of polymorphisms in six candidate genes on phenytoin maintenance therapy in Han Chinese patients. *Pharmacogenomics* 2012;13:1339-1349.
18. Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1981;30:239-245.
19. Roujeau JC. The spectrum of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a clinical classification. *J Invest Dermatol* 1994;102:28S-30S.
20. Kardaun SH, Sidoroff A, Valeyrie-Allanore L, et al. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? *Br J Dermatol* 2007;156:609-611.
21. Valenzuela C. [2 solutions for estimating odds ratios with zeros]. *Rev Med Chil* 1993;121:1441-1444.
22. Eadie MJ. Phenytoin. In: Shorvon S, Perucca E, Engel J, editors. *The Treatment of Epilepsy*. UK: Wiley-Blackwell; 2009. p. pp 604-618.
23. Micromedex® 2.0, (electronic version). [Internet]. Truven Health Analytics. [cited 05/02/2016]. Available from: <http://www.com/>
24. Caudle KE, Rettie AE, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical Pharmacogenetics micromedexsolutions Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and HLA-B Genotypes and Phenytoin Dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2014;96:542-548.
25. สถาบันประสาทวิทยา. แนวทางเวชปฏิบัติโรคลมชักสำหรับแพทย์ (Clinical Practice Guidelines for Epilepsy). กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย: บริษัท ธนาเพรส จำกัด; 2559.

26. Smollin C. Chapter 126. Phenytoin. In: Olson KR, editor. *Poisoning & Drug Overdose*, 6 ed. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2012.

A01

Rimantadine is More Toxic than Amantadine on Human Astrocytes and Human Neurons

Thitima Kasemsuk¹, Kitti Chattrakulchai², Pornpun Vivithanaporn²

¹ *Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20130, Thailand*

² *Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

Abstract

Amantadine, an anti-influenza drug, has also been used as the alternative treatment of Parkinson's disease. The common side effects of amantadine are nausea, dizziness and confusion. Rimantadine is a derivative of amantadine with comparable efficacy and effectiveness on influenza to amantadine but less side effects on the central nervous system. However, the use of rimantadine in Parkinson's disease is limited only in case reports. Amantadine and its derivatives have anti-proliferative effects on lymphocytes; therefore, the side effects on the central nervous system of amantadine and rimantadine could be caused by their cytotoxicity to neurons and astrocytes. This study aimed to compare cytotoxicity of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride on cultured human astrocytes and neurons. Cytotoxicity of A172 human astrocytoma and CHP-212 human neuronal cell lines was assessed using MTT assays. Amantadine and rimantadine decreased viability of human astrocytes and neurons in a dose-dependent manner at 24 and 48 hours. The median toxic concentrations (TC₅₀) of amantadine and rimantadine on A172 were 140.7±1.2 µM and 62.9±1.2 µM, respectively; while TC₅₀ values on CHP-212 were 325.7±1.6 µM and 98.2±1.1 µM, respectively. The present study demonstrates that rimantadine is more toxic than amantadine on human astrocytes and human neurons, indicating that the use of rimantadine for neurodegenerative treatment may be limited due to its cytotoxic effect. The mechanisms underlying cytotoxicity of rimantadine will be further investigated.

Keywords: Amantadine, rimantadine, cytotoxicity, astrocyte, neuron

A02

The *in vitro* Antimalarial Activities of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.**Wanna Chaijaoenkul¹, Kesara Na-Bangchang¹**¹ *Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand***Abstract**

Multidrug resistance malaria is a global health problem worldwide particularly in Thailand. The development of novel antimalarial drugs are urgently needed. The aim of the present study was to investigate antimalarial activity and time dependent action of the crude ethanolic extracts of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. rhizome against 3D7 *Plasmodium falciparum*. Antimalarial activities were evaluated using fluorescent-based assay. The IC₅₀ value (concentration that inhibits malaria parasite growth by 50%) was evaluated using CalcuSyn software. The synchronized parasites in ring stage were exposed to *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. extract at various concentrations, *i.e.*, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/mL for 3, 6, 12, 24, and 48 h (37°C). The 200 µM of dihydro-artemisinin was used as positive control. Cultures were washed out and incubated with complete media until 48 h. The IC₅₀ of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. was 20 µg/mL. The antimalarial action started at 12 h after exposure. There was no difference in IC₅₀ values following the 24- and 48-h exposure. In conclusion, the ethanolic extract of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. exhibited moderate antimalarial activity (IC₅₀ value ranging from 11 to <26 µg/mL was classified as moderate activity), on the trophozoite stage (at 12 h).

Keywords: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC., antimalarial, *Plasmodium falciparum*

A03

Pharmacological Evidence of EDHF-Mediated Vasorelaxation in Response to *Moringa Oleifera* Leaf Extract in L-NAME Induced Hypertensive Rats

Direk Aekthammarat¹, Patchareewan Pannangpetch¹, Panot Tangsucharit¹

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Abstract

Endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs) are the main vasodilatory mediators of resistance which are important in regulating blood pressure. EDHFs have been suggested to compensate for impaired nitric oxide (NO) release in patients with essential hypertension. This study aimed to determine the antihypertensive effect of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves (MOE) and its effect on EDHF-mediated vasorelaxation in hypertensive rats induced by N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME). Male Wistar rats were administrated with L-NAME (50 mg/kg/day) in drinking water for 3 weeks. Acute hypotensive activity of MOE was tested in anesthetized rats by means of intravenous injection of the extract, and the changes in arterial pressure were measured via femoral artery catheterization. The results showed that MOE (0.1-3 mg/kg) caused a dose-dependent reduction in mean arterial blood pressure (7.13 ± 0.47 - $29.76 \pm 1.86\%$) with no significant change in heart rate. The vaso-relaxant activity of MOE was investigated in resistance arteries using perfused isolated mesenteric arterial beds. The injection of MOE (0.001-0.3 mg in 0.1 ml injection volume) into the perfusate caused a concentration-dependent relaxation with a maximum relaxation of $75.57 \pm 1.76\%$ achieved at 0.3 mg which was abolished by endothelium denudation ($15.36 \pm 1.00\%$, max. relaxation). The inhibition of NO, PGI₂ and H₂S productions did not affect the MOE induced endothelium-dependent relaxation ($84.76 \pm 3.35\%$, max. relaxation). Interestingly, this persisting relaxation was significantly inhibited by calcium-activated potassium channel blocker (5 mM tetraethylammonium), myoendothelial gap junction inhibitor (10 μM 18α-glycyrrhetic acid), and high potassium medium (45 mM KCl) with a maximum relaxation of 68.28 ± 1.83 , 32.78 ± 1.07 , and only $17.90 \pm 1.64\%$, respectively. These findings demonstrate that the endothelium-dependent vasorelaxation in response to MOE may be mediated via EDHF release. Thus, we conclude that MOE has antihypertensive effect possibly by inducing of EDHF mediated vasorelaxation.

Keywords: Antihypertensive effect, EDHF, *Moringa Oleifera*, vasorelaxation

A04**Cysteinyl Leukotriene Receptor Antagonists Suppress the Growth and Induce Cell Death in Human Glioblastoma****Tipparat Parakaw^{1,3}, Pannaree Piromkraipak¹, Kulathida chaithirayanon², Sirada Srihirun³, Pornpun Vivithanaporn¹**¹ Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand² Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand³ Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand**Abstract**

Overexpression of 5-lipoxygenase (5-LOX) and cysteinyl leukotriene receptors is associated with various types of cancers, including astrocytoma. A recent epidemiology indicates the use of cysteinyl leukotriene receptor antagonists lower the risk of cancers in asthma patients. Inhibition of the 5-LOX pathway partially suppresses proliferation of human glioma cell lines. This study aimed to investigate the growth inhibition and cytotoxic effects of montelukast and zafirlukast in A172 human glioblastoma cells using flow cytometry. Cell proliferation and apoptosis were determined by comparing carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) fluorescent decay and annexin V-FITC/7-AAD staining assays. Daily treatment with 20 μ M zafirlukast decreased proliferation at day 3 and 5 while 20 μ M montelukast suppressed proliferation only at day 5. In contrast, montelukast was more toxic than zafirlukast. At 24 hours post-exposure, annexin V positive cells were 81.3% and 35.0% in 20 μ M montelukast and zafirlukast, respectively. These results suggest that montelukast and zafirlukast potentially suppress tumor growth and induce cell death in human glioblastoma cells.

Keywords: Montelukast, zafirlukast, apoptosis, glioblastoma

A05

Cytotoxicity and Apoptosis Inducing Effect of Plumbagin on Cholangiocarcinoma Cell

Luxsana Panrit¹, TullayakornPlengsuriyakarn², Kesara Na-Bangchang²

¹ *Drug discovery and development center Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand*

² *Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand*

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a cancer that arises from the epithelial cell of the bile duct both inside and outside the liver. CCA is an important public health problem in several parts of Southeast Asia, particularly in the northeastern region of Thailand. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) is a major constituent isolated from the root of *Plumbagoindica* Linn. The compound has been shown to exhibit a wide spectrum of pharmacological activities. The aim of the study was to investigate the cytotoxic and apoptosis of plumbagin on the CCA cell line CL-6. Based on results of the cytotoxicity test using MTT assay, the median of 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values of plumbagin and the standard drug 5-fluorouracil (5-FU) were 22.64 and 1,057.33 μM, respectively. The mechanisms of apoptosis induction were determined by CellEvent™ Caspase-3/7 assay and flow cytometry (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit). After 24-h exposure, the compound activated caspase-3/7 and induced apoptosis by the occurrence of 39.84% early apoptotic cells and 59.69% late apoptotic cells compared with untreated. Plumbagin could be a promising candidate for further development for treatment of cholangiocarcinoma.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Plumbagin, cytotoxicity, apoptosis

A06

Study on Anticancer Activity of Ethyl-*p*-Methoxycinnamate to Cholangiocarcinoma**Phunuch Muhamad¹, Luxsana Panrit¹, Wanna Chaijaroenkul², Kesara Na-Bangchang²**¹ *Drug Discovery and Development Center, Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand*² *Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand***Abstract**

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignancy of the biliary duct system that almost found in Thai population living in the North-Eastern region. Treatment of CCA became more difficult since cancer cells resisted to the commonly used chemotherapeutic drug, 5-fluorouracil (5-FU). *Kaemferia galanga* Linn (KG) is a medicinal plant available in Thailand and other tropical countries. Ethyl- *p*- methoxycinnamate (EPMC) isolated from KG extracts has several pharmacological actions including anti-inflammation and anti-neoplastic. Consequently, the present study aimed to investigate the anticancer effect of EPMC to CCA using cholangiocarcinoma cell line (CL-6) by assessment of cytotoxicity, morphologic change, cell cycle arrest, apoptosis and selectivity to normal cells. The cytotoxicity test in CL-6 using MTT method revealed EPMC IC₅₀ value of 251.8 ± 13.0 µg/mL. Cell morphology following 48-h EPMC exposure showed decreased cell viability related to EPMC concentration by presenting of cell shrinkage, cell membrane blebbing and lower level of cell adherence. Cell cycle arrest at G2/M phase and apoptosis in CL-6 cell line exhibited after incubation with 252 µg/mL EPMC for 48 h. In addition, *in vitro* determination of primary safety of EPMC found that the selectivity index (or IC₅₀ ratio between human fibroblast cells (OUMS) and CL-6) of EMPC was 3.6. These findings indicated that EPMC could be a promising compound to be developed as an anticancer drug or a supplement for cholangio-carcinoma treatment.

Keywords: Cholangiocarcinoma, ethyl-*p*-methoxycinnamate, cytotoxicity, cell cycle arrest, apoptosis

A07

Antiviral and Anti-inflammatory Effects of α -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn. in Dengue Virus Infection

Mayuri Tarasuk¹, Pucharee Songprakhon², Pa-thai Yenchitsomanus², Kesara Na-Bangchang¹

¹ Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

² Division of Molecular Medicine, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

Abstract

Dengue virus (DENV) infection is a global public health problem. The severity of disease in the patients with dengue infection correlates with high viral load and excessive immune activation which creates a cascade of cytokine production, called “cytokine storm”. Currently, neither a preventive vaccine nor an effective therapeutic agent is available. Thus inhibition of DENV and cytokine production could be expected to enhance therapeutic effects for DENV infection. In this study we investigated antiviral and anti-inflammatory activities of α -mangostin (α -MG) from *Garcinia mangostana* Linn. against dengue virus infection by determining its effect on cell infection rate, viral production, and cytokine/chemokine expression after the cells were infected with dengue virus. Our data demonstrated that α -MG could effectively inhibit dengue virus infection. Treatment of dengue infected cells with α -MG significantly reduced cell infection rates and viral release into the culture supernatant. Furthermore, treatment with α -MG could effectively reduce cytokine (IL-6 and TNF- α) and chemokine (RANTES, MIP-1 β , and IP-10) transcription. Overall, cytokine/chemokine gene expression was more robustly inhibited by α -MG than antiviral agent, ribavirin, and anti-inflammatory drug, dexamethasone. α -MG is a promising compound for the development of direct-acting antivirals against DENV infection. Moreover, it has a potent anti-inflammatory effect that offers a greater efficiency to combat dengue virus infection.

Keywords: Dengue virus, α -mangostin, antiviral, anti-inflammatory, cytokine, chemokine

A08

Phytochemical Properties, Acute and Subacute Oral Toxicity of Crude Water Soluble Extract of *Tradescantia fluminensis* in Wistar Rats**Kanyarat Boonprasert¹, Tullayakorn Plengsuriyakarn¹, Ngampuk Tayana², Somboon Kiettinun¹, Kesara Na-Bangchang¹**¹ Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand² Drug Discovery and Development Center, Thammasat University¹, Pathum Thani 12121, Thailand**Abstract**

Tradescantia fluminensis (TF) has been used as an alternative treatment in Thai traditional medicine for renal failure. However, information on its toxicity and phytochemical properties has not been investigated. In this study, acute and subacute (repeated dose 28-day) toxicity in Wistar rats and phytochemical constituents of the crude water soluble extract of *T. fluminensis* were evaluated. For acute toxicity, the extract was administered orally at the highest starting dose level (5,000 mg/kg body weight) and signs of toxicity were observed during the first 30 minutes, periodically during first 24 hours, and then daily for 14 days. For subacute toxicity, the extract was given at the daily dose of 1,000 mg/kg body weight for 28 days and signs of toxicity were observed daily. The phytochemical constituents (phenols, flavonoids, anthocyanins, triterpenes/steroids, alkaloids, anthraquinones, coumarin, saponins, quinone, tannins, sugar, proteins and amino acid, glycosides, fat and essential oil, and phloroglucinol) of the extract were determined based on color intensity or precipitate formation. Results showed that crude water soluble extract of *T. fluminensis* exhibited no significant sign of toxicity (physiology and laboratory parameters) and none of the animals died during the observation period. The major constituents of the extract included phenol, tannins, and saponins. Therefore, non-clinical toxicity study in rats suggests good tolerability profile of the crude water soluble extract of *T. fluminensis*. Further study will be performed to investigate its efficacy in the treatment of renal failure in the animal model.

Keywords: *Tradescantia fluminensis*, phytochemical screening, acute toxicity, subacute toxicity, crude extract

A09

The Effect of Pomelo Juice and Methanolic Extract on Lipid Peroxidation in Platelet Suspensions

Jindaporn Janprasit¹, Rataya Luechapudiporn², Noppawan Phumala Morales¹, Ken-ichi Yamada³

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

² Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³ Physical Chemistry for Life Science Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Abstract

Oxidative stress and free radical reaction in platelet involve in hyperactivity of platelet and thus contribute to cardiovascular complications. The pomelo (*Citrus maxima* Merr.) is the largest citrus fruit that enrich with phenolic compounds and flavonoids such as keamferol and luteolin. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of pomelo juice and its methanolic extracts of three cultivars (Thong Dee, Khao Yai and Khao Tang Kwa) on lipid peroxidation in platelets. Platelets suspension was prepared from rat plasma, washed and suspended in Tyrode's buffer containing 0.35% BSA. Lipid peroxidation was induced by 20 mM of 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH). Lipid radicals were detected by a novel profluorescence nitroxide switch probe. Fluorescence intensity, at excitation wavelength 470 nm and emission wavelength 530 nm, was followed for 90 min. Pomelo juice and methanolic extract demonstrated the inhibitory effect on AAPH induced lipid radicals in platelets. The methanolic extract of Thong Dee showed the highest antioxidant effect on platelet lipid peroxidation. The %inhibition was 78% and 64% when the incubation time was 5 and 30 min, respectively. The pomelo juice exerted the inhibitory effect about 38-43% and 26-29% in event of incubation time 5 and 30 min, respectively. There was no significant difference among three cultivars of pomelo juice. The antioxidant activity may relate to phenolic and flavonoid contents in different pomelo cultivars. Since the formation of lipid radicals relates to platelet functions, methanolic extract from Thong Dee will be further identified and studied on platelet functions.

Keywords: Fluorescence probe, lipid peroxidation, platelets

A10**Cytotoxic, Apoptotic and Inhibitory Activities on Cell Migration of Atractylodin in Cholangiocarcinoma Cell Line****Tullayakorn Plengsuriyakarn, Kesara Na-Bangchang***Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand***Abstract**

Cholangiocarcinoma (CCA) is an important cancer in the Great Mekong region, particularly in Thailand. Limitation of treatment option and the lack of effective diagnostic tool for early detection of CCA are of major concerns for the control of this type of cancer. The aim of the study was to investigate cytotoxic, apoptotic and inhibitory activities on cell migration of atractylodin, the active constituent of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. against CCA cell line CL-6. MTT assay was used to test cytotoxicity and Real-Time Cell Analyzer Dual purpose: RT-CA DP system was used to test cell migration. CellEvent™ Caspase-3/7 assay was an assay for detection caspase-3/7 activity resulting from cell undergone apoptosis. The median IC₅₀ (concentration that inhibits cell growth by 50%) of cytotoxic activity of atractylodin was 39.5 µg/mL. Atractylodin produced inhibitory activity on cell migration inducing cell apoptosis. Results suggest the potential role of atractylodin for further development as chemotherapeutic for CCA.

Keywords: Cholangiocarcinoma, atractylodin, cytotoxicity, cell migration

A11

Atractylodin from *Atractylodes Lancea* Induces Apoptosis and Inhibits Growth of Human Cholangiocarcinoma Cells

Vivek Bhakta Mathema¹, Kanawut Kotawong¹, Kesara Na-Bangchang^{1,2}

¹ Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

² WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Klongluang, Pathum Thani 12120, Thailand

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a progressively fatal form of cancer arising from malignant transformation of hepatic biliary cholangiocytes. Countries like Thailand, Laos and Cambodia are known to have high incidents of this cancer. The objective of this study was to evaluate growth inhibitory activity of atractylodin, a bioactive sesquiterpenoid present in rhizomes of *Atractylodes lancea* in CCA-associated cell line (CL-6). Here we determine cytotoxicity and potential effects of atractylodin on cell cycle arrest of CL-6 cells using standard MTT assay and flow cytometry respectively. In addition, western blotting was used to evaluate the effect of atractylodin on STAT 1/3 activation and heme oxygenase-1 production. The results showed that atractylodin treatment exhibited cytotoxicity with IC₅₀ of 221.25 ± 11.42 μM (mean ± SD). Atractylodin proficiently induced apoptosis at 48 h after treatment and cell cycle arrest of CL-6 cells was observed at G1 phase. Moreover, atractylodin treatment resulted in suppression of STAT1/3 activation and HO-1 production in CL-6 cells. Taken together, the results suggest that atractylodin holds therapeutic potentials and demands further in-depth studies in CCA research.

Keywords: Atractylodin, *Atractylodes lancea*, cholangiocarcinoma

A12

Anticholangiocarcinoma and Toxicity Evaluation of *Kaempferia galanga* L. Rhizome Extract**Asmare Amuamuta¹, Tullayakorn Plengsuriyakarn^{1,2}, Kesara Na-Bangchang^{1,2}**¹ Chulabhorn International College of Medicine (CICM), Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand.² Thailand Center of Excellence for Drug Discovery and Development (DDD), Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand.**Abstract**

Cholangiocarcinoma (CCA) is an important public health problem in several tropical and subtropical parts of the world, particularly Thailand. Chemotherapy against CCA is largely ineffective and discovery and development of effective chemotherapeutics is urgently needed. The objective of the study was to evaluate the anti-CCA potential as well as toxicity of the crude extract of *Kaempferia galanga* L. both *in vitro* and in animal models. The ethanolic extract of *K. galanga* L. rhizome and the standard anticancer drug 5-fluorouracil (5-FU) were evaluated for their cytotoxic activities against CCA cell line (CL-6) using MTT cell proliferation assay. Acute and subacute toxicity of the extract were evaluated in ICR mice according to the OECD guidelines and anti-CCA activity was evaluated in CCA-xenografted nude mice. Results of cytotoxicity test showed moderate activity of the extract with median (range) 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 64.2 (57.76-72.11), while the IC₅₀ of 5-FU was 107.1 (103.53-109.64) µg/mL. Toxicity testing revealed no overt toxicity up to the maximum single oral dose of 5,000 mg/kg body weight and up to daily dose of 1,000 mg/kg body weight for 30 days. In addition, the extract at the dose level of 1,000 mg/kg body weight given daily for 30 days exhibited promising anti-CCA activity in CL6-xenografted nude mice as determined by tumor growth inhibition (TGI) and prolongation of survival time. In an effort for further developing an effective drug option against CCA, further studies should be carried out to investigate this potential herbal agent.

Keywords: Cholangiocarcinoma, *Kaempferia galanga*, toxicity, CL-6, anti-CCA, nude mice

A13

Cytotoxic Activities and Effects of β -Eudesmol against Cholangio-carcinoma Cell Line

Kanawut Kotawong¹, Vivek Bhakta Mathema¹, Wanna Chaijaroenkul¹, Kesara Na-Bangchang¹

¹ Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a form of bile duct cancer that has high mortality rate, particularly in Thailand. β -Eudesmol, a compound isolated from *Atractylodes lancea* has been shown to exhibit promising activity against CCA both *in vitro* and *in vivo*. The aim of this study was to further evaluate the mechanisms through which the compound exerts its anti-CCA activity. The CCA cell lines (CL-6) was exposed to β -eudesmol at various concentrations. Cytotoxicity and apoptosis inducing activity were measured using MTT assay and flow cytometry, respectively. Western blotting was performed to assess STAT1/3 activation and heme oxygenase-1 (HO-1) production in CL-6 cells. The results demonstrated that the IC₅₀ of β -eudesmol against CL-6 was 39.33 \pm 1.15 μ g/mL (mean \pm SD) and cell cycle arrest was observed at the G1 phase. Moreover, β -eudesmol potently induced cell apoptosis at 48 h postexposure. Inhibition of protein activation of both STAT1 and STAT3 by suppressing the STAT phosphorylation was observed in a concentration-dependent manner. β -Eudesmol exposure also inhibited HO-1 expression in CL-6 cells in a time-dependent manner. The results suggest that β -eudesmol holds therapeutic potentials and demands further in-depth studies in CCA research.

Keywords: β -Eudesmol, *Atractylodes lancea*, cholangiocarcinoma, cell cycle arrest, cell apoptosis

A14

Antiproliferative Effects of Oxepin-Annulated Coumarins on Human Cancer Cell Lines**Wiratchanee Mahavorasirikul¹, Nongnaphat Duangdee¹, Saisuree Prateeptongkum²**¹ Drug Discovery and Development Center, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12121, Thailand² Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand**Abstract**

Coumarins, natural or synthetic compounds, have been attracting interest due to their broad spectrum of pharmacological activities including anti-inflammatory, anti-HIV, antitumor, antioxidant, antimicrobial, antifungal, anti-arrhythmic effects. Large number of natural products containing oxepine ring, seven-membered oxygen heterocycle, such as pterulone and heliannuol A show diverse biological and pharmacological activities ranging from anti-depressant, analgesic, anti-inflammatory, anti-microbial, antioxidant, antitumor to anti-apoptosis. Coumarins fused with heterocycles have gained increasing attention due to their potential biological activities. However, few of medium ring oxacycle fused coumarins have been synthesized. Therefore, the aims of this study were to synthesize oxepin-annulated coumarins and evaluate their *in vitro* antiproliferative activity. The required oxepin-annulated coumarins were synthesized from coumarin precursors through key intermediate diallylated coumarin derivatives. The *in vitro* antiproliferative activity of these compounds and its key intermediates on three cancer cell lines; breast (SKBR3), colon (Caco-2) and liver hepatocellular (HepG2) were determined by MTT assay. The results showed that all 11 coumarin derivatives caused a dose-dependent reduction in cell viability in all three cancer cell lines after 48-h incubation. Based on 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values, 4-propyl-8,11-dihydro-2H-oxepino[2,3-*h*]chromen-2-one as the oxepin-annulated coumarin showed highest antiproliferative activity on all three cancer cell lines; SKBR3 (IC₅₀; 11.18±1.93 μg/mL), Caco-2 (IC₅₀; 30.05±0.71 μg/mL) and HepG2 (IC₅₀; 15.32±0.30 μg/mL). These findings show that our oxepin-annulated coumarins exert an antiproliferative effect and could be used as a starting point for development of powerful coumarin anticancer therapies.

Keywords: Coumarins, oxepine, SKBR3, HepG2, Caco-2

A15

Mutagenic and Apoptotic Activities of Ethanolic Extract and Bioactive Components of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. in Cholangiocarcinoma Cell Lines

Siriprapa Warathumpitak, Tullayakorn Plengsuriyakarn, Kesara Na-Bangchang

Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Graduate Program in Bioclinical Sciences, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand.

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is the cancer of bile duct that has high incidence and high mortality rate, particularly in the Northeastern part of Thailand. *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. (AL) has been traditionally used as crude extract in different treatment of various diseases in China, Japan, and Thailand. It contains several bioactive components (atractylodin, β -eudesmol, hinesol and atractylone) that show the pharmacological activities against CCA. Therefore, the present study focused on the effect of AL ethanolic extract (ALE), atractylodin and β -eudesmol on mutagenicity and apoptotic activity by using micronucleus test and JC-1 fluorescence method. CCA cell lines (CL-6 and HUCCT-1) and normal human embryonic fibroblast cell line (OUMS-36T-1F) were used in this experiment. The result showed that ALE, atractylodin and β -eudesmol increased the number of micronucleus in CL-6 and HUCCT-1 cells compared with untreated cells but not observed in OUMS-36T-1F cells. In the part of apoptotic activity, apoptosis inductions by ALE and atractylodin were observed in CL-6, HUCCT-1 and OUMS-36T-1F cells whereas β -eudesmol-induced apoptosis was found in CL-6 cells only. These results provided safety data for future development of ALE, atractylodin and β -eudesmol as drug candidates for treatment of CCA.

Keywords: *Atractylodes lancea*, micronucleus, mutagenicity, JC-1 fluorescence method, apoptosis

A16

Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. Drug Development for Treatment of Bile Duct Cancer*Thananchanoke Rattanathada¹, Siriprapa Warathumpitak¹, Asmare Amuamuta Limeneh¹, Rathapon Asasutjarit², Tullayakorn Plengsuriyakarn¹, Sumet Kongkiatpaiboon³, Kesara Na-Bangchang¹**¹ Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand² Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand³ Drug Discovery and Development Center, Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand**Abstract**

Cholangiocarcinoma (CCA) is the cancer of bile duct with high incidence and mortality rate especially in the northeastern region of Thailand. Disease diagnosis of early stage as well as treatment options is unsatisfactory. Standard treatment with conventional chemotherapeutic drugs is disappointing with low cure rates. The ethanolic extract of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. (AL) has been found that it has cytotoxic activity against cholangiocarcinoma (CCA) cell lines. The aims of the studies were divided into 4 parts, namely, optimization of extracting method, large scale production of AL extraction, formulation of AL capsule and acute/subchronic toxicity evaluation of AL capsules on Wistar rats. To investigate cytotoxic activity against cholangiocarcinoma (CCA) cell line of the ethanolic extract of *A. lancea* (ALE) obtained from two traditional herbal shops in Nakhon-Pathom (NP) and Bangkok (CP), three different extraction procedures, namely, maceration, sonication, and heat-reflux were used to prepare ALE. Cytotoxic activity of the extracts and 5-fluorouracil (standard control) on CCA cell line (CL-6) and normal human embryonic fibroblast cells (OUMS-36T) was evaluated using standard MTT assay at the concentration range of 0-250 µg/mL. Results showed that the ethanolic extract of AL obtained from both NP and CP prepared by sonication exhibited the highest cytotoxic activity against CL-6 cells with IC₅₀ values (mean±SD) of 26.15±0.48 and 28.29±0.13 µg/mL, respectively. The maceration, although not the most efficient method, was selected for further optimization due to its simplicity, cost-effectiveness, and applicability for large scale production. The 24-h maceration of AL (obtained from NP) twice, provided the most suitable condition to prepare the extract with regard to the extraction yield and cytotoxic activity (9.95% yield, IC₅₀: 33.15±2.50 µg/mL). To produce large scale of AL crude, a 24-h maceration of 60 kg of ground AL rhizome has been performed using 95% ethanol to be solvent by the ratio 1:5 (w/v) twice. Rotatory evaporation and freeze drying have been performed to dry the ALE. Cytotoxic activity of the large scale ALE against CL-6 cells was demonstrated with an IC₅₀ value of 29.60±2.24 µg/mL. To formulate the AL capsule, AL mixture has been mixed using lactose by the ratio 1:3 (w/w). Sodium lauryl sulfate was chosen to be a surfactant. Lactose

Address correspondence and reprint request to: Kesara Na-Bangchnag, Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand.

E-mail address: kesaratmu@yahoo.com

has been chosen to be a water-soluble filler. Talcum has been chosen to be a glidant. Capsules No. 00 has been chosen to be filled 0.6016 g of formulated AL powder. From the maximum recommended starting dose (MRSD) (calculation, the MRSD of AL crude extract is 2.14 g. However, for the preliminary clinical trial, 1 g of AL capsules will be orally administered to the subjects. Therefore, nine capsules will be orally administered for 1 g of AL crude. To evaluate the acute/subchronic toxicity, AL formulation was orally administered to Wistar rats for safety/toxicity evaluation. For acute toxicity, a single oral administration of AL formulation was performed at a dose of 5,000 mg/kg (5 females/5 males) to the treated group and control group were fed by 20% tween 80. The study of subchronic toxicity was determined by oral feeding (both female and male rats) daily with the test substance at the dose of 1000, 3000 and 5000 mg/kg and a control group fed with 20% tween 80 continuously for 90 days. Evaluation of the acute toxicity test showed neither mortality nor significant differences in general behavior, physiological activities, food and water consumption and the body weights between controls and treated animals. Moreover, gross pathological changes were not comparatively detectable between all controls and treated animals of both sexes at autopsy. In subchronic toxicity evaluation, no mortality was observed when varying doses of 1000, 3000 or 5000 mg/kg of AL formulation were administered. There were no significant differences in general behaviors, food and water consumption and body weights between controls and treated animals of both sexes. Macroscopic observations of internal organs or tissues at autopsy both in the treated and control rats showed no changes. These results indicate that AL capsule is basically safe for further study in clinical trials. However, the pharmaceutical properties should be evaluated. The chronic toxicity should be studied as well.

Keywords: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC., capsule formulation, extracting method, acute and subchronic toxicity

A17

Antimalarial Activity of Isolated Compounds from *Stephania venosa***Artitaya Thiengsusuk¹, Wanna Chaijaroenkul², Sumet Kongkiatpaiboon¹, Nongnaphat Duangdee¹, Saisuree Prateeptongkum³, Kesara Na-Bangchang²**¹ Drug Discovery and Development Center, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathum Thani 12121, Thailand² Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand³ Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand**Abstract**

Malaria is a fatal infectious disease in tropical and subtropical regions especially along the Thailand-Myanmar and Thailand-Cambodia borders. Effective development of new alternative antimalarial drugs development is urgently required due to the spread of artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. The aim of this study was to assess the antimalarial activity of the isolated bioactive compounds from *Stephania venosa*. The phytochemical analysis of the extract was investigated by using HPLC. The *in vitro* antimalarial activities of the bioactive compounds were assessed using SYBR green-I assay. Results revealed that berberine, stephanine and oxocrebanine alkaloids are major components found in *S. venosa*. The median IC₅₀ values of three bioactives against 3D7 and K1 were less than 10 µg/mL for both clones. The median IC₅₀ values of berberine were 0.024 and 0.035 µg/mL, respectively. The median IC₅₀ values of stephanine were 2.0 and 2.5 µg/mL, respectively. The median IC₅₀ values of oxocrebanine were 2.2 and 2.7 µg/mL, respectively. It could be concluded that berberine has the promising antimalarial activity and *in vivo* activity should be confirmed in malaria-infected mouse model.

Keywords: Antimalarial drug, berberine, stephanine, oxocrebanine

A18

Effect of β_2 -Adrenergic Receptor (β_2 -AR) Agonists on β_2 -AR-Mediated Inhibition of Insulin-Induced GLUT4 Translocation and GLUT4 mRNA Expression

Warisara Parichatikanond, Supachoke Mangmool

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Abstract

Insulin resistance is a condition in which there are defects in the insulin actions to induce tissue glucose uptake by inhibiting glucose transporter type 4 (GLUT4) translocation and GLUT4 mRNA expression. Our previous study has reported that overstimulation of β_2 -adrenergic receptors (β_2 -ARs) was associated with the pathogenesis of insulin resistance in the heart. However, the mechanisms by which β_2 -agonists affect insulin resistance in the heart are incompletely understood. This study aimed to investigate the effect of β_2 -agonists (e.g., salbutamol, salmeterol, and formoterol) on insulin-induced GLUT4 translocation in β_2 -AR-overexpressing human embryonic kidney cells 293 (HEK-293) and on insulin-induced GLUT4 mRNA expression in rat heart myoblastic cells (H9C2). In this study, we found that salbutamol, salmeterol, and formoterol (10 μ M) significantly inhibited insulin-induced GLUT4 translocation in HEK-293 after long-term (3-h) stimulation of β_2 -ARs. The percentages of cells with GLUT4 translocation to the membrane were 66.8, 31.3, 31.5, and 26.0 by the treatment of vehicle, salbutamol, salmeterol, and formoterol, respectively. However, no changes were observed after short-term exposure (15-min) to these β_2 -agonists. Moreover, GLUT4 mRNA expression of H9C2 cells was significantly reduced by β_2 -agonists (10 μ M). The folds over basal change of relative GLUT4 mRNA level were 2.4, 1.6, 1.7, and 1.4 in cells treated with insulin alone or insulin together with salbutamol, salmeterol, and formoterol, respectively. These findings indicated that prolonged stimulation of β_2 -ARs by β_2 -agonists may enhance insulin resistance by suppressing of GLUT4 translocation and GLUT4 mRNA expression. The impact of this study helps us to understand the molecular mechanism of β_2 -agonists on the induction of insulin resistance which would help physicians to choose the proper β_2 -agonists for each individual patient.

Keywords: Insulin resistance, β_2 -agonist, β_2 -AR, GLUT4 translocation, GLUT4 mRNA expression

A19

Inhaled Nebulized Sodium Nitrite Showed No Effect on Lipid Peroxidation in Hemoglobin E/ β -Thalassemia Patients: A Preliminary Result**Jirada Kaewchuchuen¹, Thanaporn Sriwantana¹, Sirada Srihirun², Pornpun Vivithanaporn¹, Supeenun Unchern¹, Nathawut Sibmooh¹**¹ *Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*² *Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand***Abstract**

Nitrite, bioactive nitric oxide metabolite, is found in vegetables, dietary and preserved food. Nitrite acts as an endogenous vasodilator presenting in erythrocytes and plasma. Since nitrite in solution is inexpensive source of nitric oxide, and convenient to use, inhaled sodium nitrite is being investigated in phase 2 clinical trial for treatment of pulmonary hypertension in HbE/ β -thalassemic patients. One of possible adverse effects of inhaled nitrite is oxidative stress. The effect of nitrite on lipid peroxidation has not been reported in humans. In this study, we investigated the effect of nebulized sodium nitrite on lipid peroxidation in HbE/ β -thalassemia patients (n=5) following a 15-mg single dose administration, an effective dose for pulmonary artery dilation in thalassemia patients with pulmonary hypertension. Blood samples were collected before and after administration (at 0, 10, 60 and 120 min). Whole blood nitrite was measured using chemiluminescence method. 8-Isoprostanes and thiobarbituric reactive substances (TBARS) were determined as markers of lipid peroxidation using ELISA technique and spectro-fluorometric method, respectively. The preliminary results showed that, immediately after 15 mg nitrite inhalation, nitrite levels in whole blood increased from 164.0 \pm 47.4 to 421.0 \pm 92.9 nM and decreased with a half-life of 51.2 \pm 5.7 min. No significant changes in TBARS in plasma and erythrocytes as well as 8-isoprostanes levels in plasma were observed. We conclude that a single dose of 15-mg inhaled nebulized sodium nitrite has no effect on lipid peroxidation in HbE/ β -thalassemia patients. Further study in larger number of subjects is required.

Keywords: Sodium nitrite, HbE/ β -thalassemia patients, pulmonary hypertension, nitric oxide

A20

Deferiprone Increases Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cells

Thanaporn Sriwantana¹, Kittiphong Paiboonsukwong², Suthat Fucharoen², Pornpun Vivithanaporn¹, Jirada Kaewchuchuen¹, Nathawut Sibmooh¹

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

² Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Abstract

Nitric Oxide (NO) produced from endothelial nitric oxide synthase (eNOS) regulates vascular homeostasis by causing vasodilation, inhibition of leukocyte adhesion, and platelet inhibition. In blood, NO is converted to nitrite anion (NO₂⁻), a stable derivative of NO, which serves as a bioactive form stored in erythrocytes. Decreased NO bioavailability which represents endothelial dysfunction is present in thalassemia, and is related with oxidative stress and iron overload. As deferoxamine and deferiprone can improve endothelial function in thalassemia, we hypothesized that deferiprone alone could increase NO synthesis by endothelial cells. The effects of acute deferiprone administration on blood nitrite in 20 healthy and 20 β-thalassemia/hemoglobin E subjects were studied. In addition, the effect of deferiprone on NO synthesis in primary human pulmonary arterial endothelial cells were examined *in vitro*. The nitrite levels in plasma increased by 166.9±76.6% and 97.7±31.4% (mean±SEM) at 3 h after a single oral administration of deferiprone (25 mg/kg) in healthy and thalassemia subjects, respectively. The diastolic blood pressure also decreased by 12.6±1.9% (mean±SEM) at 3 h after administration in healthy subjects, without orthostatic symptom. No change in systolic blood pressure and heart rate was observed. *In vitro* study showed that deferiprone increased cellular nitrite levels and eNOS phosphorylation at serine 1177 (marker of eNOS activation) in primary human pulmonary artery endothelial cells. We conclude that deferiprone can improve endothelial function by increased eNOS activation and NO synthesis in thalassemia.

Keywords: Nitric oxide, thalassemia, deferiprone

A21

Metformin Sensitizes Cholangiocarcinoma Cells to Cytotoxic, Antiproliferative and Antimigratory Activities of Cisplatin**Jaroon Wandee¹, Auemduan Prawan^{1,2}, Laddawan Senggunprai^{1,2}, Veerapol Kukongviriyapan^{1,2}**¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand² Liver Fluke & Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand**Abstract**

Metformin (1, 1-dimethylbiguanide hydrochloride) is the first-line drug used in type 2 diabetic mellitus. Interestingly, patients who take metformin have a reduced risk of some cancers. Moreover, metformin shows anticancer effects in many types of cancer cells including breast, esophageal, pancreatic and lung cancers. The aim of this study was to examine anticancer effect of metformin in cholangiocarcinoma (CCA) in KKU-M156 cells. The study showed that metformin sensitized CCA cells to cisplatin (Cis) on cell cytotoxicity and apoptosis, as determined by acridine orange-ethidium bromide fluorescent assay. Moreover, metformin significantly enhanced cisplatin-induced antimigration of CCA cells as determined by wound healing assay. Cis induced reproductive cell death in clonogenic assay and the effect was enhanced by metformin. To explore the mechanism of antiproliferation, cell cycle analysis was performed. The study showed that Cis and combination of Cis and metformin strongly induced cell cycle arrest at S phase. It is concluded that metformin has novel anticancer effect and may be used to enhance antitumor activities of Cis. This work was supported by grant in-aids from the Office of the Higher Education Commission through the Health Cluster of Khon Kaen University, and Research Fund from Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

Keywords: Metformin, cisplatin, cholangiocarcinoma, chemosensitization

A22

Anti-inflammatory Activity of Methanol Extract and Lignans from *Mitrephora sirikitiae* Leaves in RAW264.7 Cells

Chayaporn Limpichai¹, Natthinee Anantachoke¹, Supachoke Mangmool²

¹ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

² Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Abstract

Mitrephora sirikitiae, whose common name is Maha-Phrom-Rachini, is an endemic plant in Mae Hong Sorn province, Thailand. There is no report on biological activities of this plant. This study aimed to investigate the effects on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory mediator secretion and synthesis in RAW264.7 murine macrophage cells of the methanol extract of *M. Sirikitiae* leaves, together with lignans isolated from the extract, including epieudesmin (**1**), phyllegenin (**2**), magnone A (**3**), forsythialan B (**4**), 2-(3,4-methylenedioxyphenyl)-6-(3,5-dimethoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo-[3.3.0]octane (**5**), and 3',4-*O*-dimethyl-cedrusin (**6**). The secretion of inflammatory mediators was measured by ELISA technique. The synthesis of inflammatory mediators determined as mRNA expression was analyzed by real-time RT-qPCR and indomethacin was used as a positive control. In this study, we found that the methanol extract of *M. sirikitiae* leaves could inhibit LPS-induced PGE₂ and TNF- α secretion in a dose-dependent manner. Phyllegenin (**2**) at a concentration of 10 μ g/mL showed significant inhibition of LPS-induced PGE₂ secretion. Whereas, the lignans **3** and **5** at a concentration of 5 μ g/mL significantly inhibited the secretion of TNF- α . Moreover, the methanol extract also inhibited LPS-induced mRNA expressions of TNF- α , COX-2, and iNOS. The lignans **3** and **5** at a concentration of 5 μ g/mL significantly inhibited LPS-induced mRNA expressions of TNF- α which related to the effect on LPS-induced TNF- α secretion. The lignin **4** at a concentration of 5 μ g/mL could inhibit only LPS-induced COX-2 mRNA expression and lignans **2** and **6** at a concentration of 10 μ g/mL could decrease the COX-2 and iNOS mRNA expressions. The result of this study demonstrated anti-inflammatory action of lignans isolated from the methanol extract of *M. sirikitiae* leaves. Therefore, *M. sirikitiae* leaves containing many active compounds may play an important role for protection of inflammation in further studies.

Keywords: *Mitrephora sirikitiae*, RAW264.7, anti-inflammatory activity, PGE₂, TNF- α , COX-2, iNOS, lignans

A23

The Effects of Ethanol Extract of *Boesenbergia rotunda* Rhizomes on Learning and Spatial Memory and Hippocampal Cell Death after Common Carotid Artery Occlusion in Mice: A Preliminary study**Natnicha Dannga, Pilasluk Pansuk, Naovarat Tarasub, Sirada Rungseesantivanon, Oraphan Wanakhachonkrai***Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Pathum Thani 12000, Thailand***Abstract**

Ischemic stroke occurs when the blood supply to the brain is disrupted and may result in cognitive impairment and dementia in patients. *Boesenbergia rotunda* (BR) had been traditionally used as herbs to treat inflammation and bacterial infection. Many studies found that BR rhizome extracts had anti-inflammatory, anti-oxidant and neuroprotection. Thus, this study aimed to investigate the effect of ethanolic extract of BR rhizomes (BRE) on learning and spatial memory and hippocampal cell death in mice with cerebral ischemic-reperfusion (IR) injury. A total of 30 male ICR mice were randomly divided into 5 groups with 5-6 mice in each groups; sham-operated, bilateral common carotid arteries occlusion (2VO) and 2VO+BRE at the doses of 100, 300 and 1,000 mg/kg body weight. All animals were orally gavage once daily for 5 consecutive days after operation. Spatial memory was assessed using the Morris water maze test. At the end of experiment, the brain samples were collected. Neuronal cell death in hippocampal CA1 and CA3 subfields were determined using Cresyl violet staining. The results showed that escape latency significantly increased in 2VO group when compared to sham-operated group (30.83 ± 8.55 vs. 8.92 ± 2.18 s) ($P < 0.05$). In addition, the number of survival hippocampal neurons in 2VO group (CA1= 89.97 ± 1.01 ; CA3= 78.80 ± 4.36 cells) significantly decreased when compared to sham-operated group (CA1= 134 ± 4.21 ; CA3= 124.19 ± 3.36 cells). BRE-treated animals improved spatial memory and reduced hippocampal cell death after IR injury, but not in a dose-dependent manner. BRE at a dose of 1,000 mg/kg body weight evidently significantly reversed the learning and memory deficit (7.79 ± 2.34 s) and ameliorated the injuries of hippocampal neurons after IR insult (CA1= 103.53 ± 3.10 ; CA3= 92.22 ± 1.66 cells) ($P < 0.05$) compared to 2VO group. These results suggest that ethanolic extract of BR rhizomes is likely to have beneficial effect at least partially against IR injury induced neuronal cell death and cognitive impairment.

Keywords: *Boesenbergia rotunda*, common carotid artery occlusion, Morris water maze test, hippocampus, learning and memory deficits

A24

Induction of Intestinal Efflux Transporters and Pharmacokinetic Alterations after Multiple Oral Dosing of Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 in Rats

Tosapol Anukunwithaya¹, Phanit Songvut¹, Mayuree H. Tantisira^{2,3}, Tsutomu Shimada^{4,5}, Yoshimichi Sai^{4,5}, Phisit Khemawoot^{1,2}

¹ Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

² Chulalongkorn University Drug and Health Products Innovation Promotion Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

⁴ Department of Clinical Pharmacokinetics, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Takara-machi, Kanazawa, Japan

⁵ Department of Hospital Pharmacy, University Hospital, Kanazawa University, Takara-machi, Kanazawa, Japan

Abstract

ECa 233 is a standardized extract of *Centella asiatica*, characterized as white powder containing triterpenoid glycosides not less than 80% with a ratio of madecassoside to asiaticoside of 1.5±0.5:1. The extract has been found to exhibit various positive neurological effects. Although toxicological profiles of ECa 233 have been successively reported, the pharmacokinetic data needed for further therapeutic development are not fully elucidated. This study aimed to investigate the pharmacokinetics of multiple oral dosing of ECa 233 at 100 mg/kg/day for 7 days in rats and its effect on intestinal efflux transporters. Plasma, tissues, urine, and feces were collected from 0 to 24 h after dosing on days 1 and 7. The concentrations of asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, and madecassic acid were simultaneously analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. No significant change was observed in physical and blood biochemical parameters of the animals treated with ECa 233 for 7 days. The maximum plasma concentration and area under the curve at day 7 of madecassoside and asiaticoside decreased by 70-80% from day 1. However, both triterpenoid glycosides were extensively distributed and accumulated, resulting in significantly higher concentrations at pharmacologically relevant organs such as brain and skin. Madecassic acid and asiatic acid were major metabolites mainly found in and excreted via feces. Moreover, multiple dosing of ECa 233 increased mRNA expression of *Abcb1a* and *Abcc2* in the small intestine approximately by 2- to 3-fold. This is the first study to identify an inductive effect of a standardized extract of *Centella asiatica* after multiple oral dosing in rats. Potential drug-herb interactions when ECa 233 is co-administered with *Abcb1a* and *Abcc2* substrates calls for further investigations.

Keywords: *Centella asiatica*, Apiaceae, ECa 233, madecassoside, asiaticoside, pharmacokinetics

A25

Effects of Deoxycholic Acid in Curcumin-Formulated Liposomes on Apoptosis Induction via Caspase 3/7 Activation Pathway in Cholangiocarcinoma Cell Lines**Pattaravadee Srikoon¹, Watcharapong Chamsawang¹, Puttiporn Kongkaew¹, Kulthida Vaeteewoottacharn^{2,3}, Praweena Dana^{2,3}, Sopit Wongkham^{2,3}**¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chon Buri 20131, Thailand² Department of Biochemistry, Faculty of Medicines, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand³ Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Canter (LFRC), Faculty of Medicines, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand**Abstract**

Deoxycholic acid (DCA) is a secondary bile acid which is widely used as drug recipient for enhancing drug delivery to several types of cancer cells. This study aimed to investigate the effect of DCA curcumin-formulated liposomes on apoptosis induction of cholangiocarcinoma (CCA) cell lines. Liposome is a nanovesicular drug transportation system with the amphipathic property that can be used effectively for poor-water soluble drugs such as curcumin. DCA curcumin-formulated liposomes significantly induced cell apoptosis in KKU213 and KKU214 CCA cell lines with IC₅₀ values of 47.2 μM and 35.8 μM, respectively using MTT assay and Annexin V/viability test. Moreover, we also found the significant activation of caspase 3 and 7 pathway induced by DCA curcumin-formulated liposomes at concentration of 25-100 μM compared to liposome without curcumin and curcumin-formulated liposomes using flow cytometry. This finding showed the advantage of using DCA curcumin-formulated liposomes for enhancing curcumin efficacy which may lead to the development of specific drug delivery system for CCA chemotherapeutic agents.

Keywords: Deoxycholic acid, curcumin, cholangiocarcinoma, CCA, apoptosis

A26

Effects of Cyclopamine on Cell Viability, Cell Invasion, and 5-Fluorouracil Anticancer Activity in SW-620 Colorectal Cancer Cells

Suwisit Manmuan¹ Punyo Yoykaew², Piyachat Thuetong², Patchraporn Asipong², Nattanicha Riantong²

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

² Doctor of Pharmacy Program, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a cancer type that occurs worldwide. 5-fluorouracil (5-FU) is a current chemotherapeutic agent used as standard treatment for CRC. However, the response rate to 5-FU as monotherapy in advanced CRC patients is about 10-15%. Therefore, new potential anticancer agents that can improve the efficacy of 5-FU and/or induce resistance reversal are predominantly needed. Cyclopamine is a steroidal alkaloid extracted from corn lily plant (*Veratrum californicum*). It has been recently reported that cyclopamine inhibited medulloblastoma, prostate cancer, and breast cancer and was identified as an inhibitor of the Hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer. The objective of this study was to investigate the anticancer and anti-invasion of cyclopamine, and to determine the synergistic effect of cyclopamine and 5-FU on cell viability in CRC cells, SW-620. The results from MTT assays demonstrated that cyclopamine inhibited the growth of SW-620 cells in a time- and concentration-dependent manners after 24, 48, and 72 h exposures with the IC₅₀ values of 30.52, 23.49, and 21.99 µg/mL, respectively. The drug combination assay demonstrated that the cell viability of SW-620 colorectal cancer cells were effectively decreased after co-treatment with a low dose of cyclopamine (20 µg/mL) and 5-FU (1-50 µg/mL). Moreover, the matrigel invasion assay showed that 20 µg/mL of cyclopamine combined with 20 µg/mL of 5-FU significantly decreased percentage of proportional invasiveness ($p < 0.01$) after 48 h treatment, indicating anti-invasive activity. These findings suggest that cyclopamine is a potential compound for developing a new naturally derived anticancer agent for CRC patients in the futures.

Keywords: Cyclopamine, cell viability, colorectal cancer, 5-fluorouracil

A27**The Prevalence of Hemoglobin Type in Malaria Susceptibility and Severity****Jiraporn Kuesap¹, Kesara Na-Bangchang²**¹ Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand² Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand**Abstract**

Malaria is a mosquito-borne infectious disease affecting humans by parasites of the genus *Plasmodium*. Hemoglobinopathies are one of the factors that affect malaria disease severity. Thalassemia is associated with abnormal erythrocyte that might influence iron supply for malaria parasites growth. The association between thalassemia and malaria disease has been reported in some populations. The coexistence of thalassemia and malaria was reported to protect the infected host against malaria caused by *Plasmodium falciparum* in several areas but not by *P. vivax* in Papua New Guinea. The aim of the current study was to examine the prevalence of thalassemia in malaria patients who resided along the border areas of Thailand. Hemoglobin typing was performed using low pressure liquid chromatography (LPLC) and α -thalassemia was confirmed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) methods. Thirty percent of HbE, β -thalassemia and type 2 α -thalassemia were detected. Malaria patients with β -thalassemia and HbE with type 2 α -thalassemia are more likely to develop severe malaria. Further study with increasing sample size is needed to confirm the effect of thalassemia on malaria patients in Thai endemic areas.

Keywords: Malaria, thalassemia, hemoglobin E

A28

***Careya sphaerica* Roxb. Protected SH-SY5Y Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Cell Death**

**Rawiwun Kaewamatawong¹, Tarntip Teewasard¹, Duangkamol Uthaiwattana¹,
Chantana Boonyarat², Pornthip Waiwut¹**

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Khaen University, Khon Khaen 40002, Thailand

Abstract

Careya sphaerica Roxb. belongs to the Lecythidaceae family, is known as “Kradonbok” in Thai, widely used as traditional vegetable. The aim of this study was to investigate the neuroprotective effects of *Careya sphaerica* Roxb. extracts on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. The *Careya sphaerica* Roxb. extracts including methanol extract of leaves and flowers and butanol extract of flowers were investigated for antioxidant activity using DPPH and ABTS assays. The neuroprotective effects of *Careya sphaerica* Roxb. extracts on H₂O₂-induced neuronal cell death were determined by WST-8 assay. The marker of apoptosis, caspase-3 was observed by immunoblotting. The DPPH assay and ABTS assay results showed that the butanol extract of flowers and methanol extract of flowers and leaves at concentration 100 µg/mL had strong antioxidant activity compared to control. All extracts also possessed protective effects in SH-SY5Y cells exposed to H₂O₂ which was correlated with their inhibitory effect on caspase-3 activation using curcumin as positive control. This study suggests that the *Careya sphaerica* Roxb. extracts including methanol extract of leaves and flowers and butanol extract of flowers have neuroprotective effects on H₂O₂-induced neuron cell death, possibly due to its antioxidant effect.

Keywords: *Careya sphaerica* Roxb., neuronal cell, antioxidant, apoptosis, hydrogen peroxide

A29

Inhibitory Effect of *Artocarpus lakoocha* Roxb. and Oxyresveratrol on Alpha-Glucosidase**Matusorn Wong-on, Nanteetip Limpeanchob***Department of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Pharmacological Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand***Abstract**

Diabetes mellitus is a metabolic disease that is characterized by chronic hyperglycemia and a lack of the absolute or relative effects of insulin. The effectiveness in improving postprandial glycemic control and maintaining a normal blood glucose level could delay the progression of long-term diabetic complications. One of the treatments has been emphasized on the inhibition of gastrointestinal hydrolases, particularly α -glucosidase that plays a role in glycemic control. The α -glucosidase inhibitory effect of five active components in mulberry (*Morus alba* L.) was investigated and found that oxyresveratrol was effective more than acarbose, an α -glucosidase inhibitor. Oxyresveratrol is also a major constituent of the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. It was found that the quantity of oxyresveratrol in water extract of *A. lakoocha* was higher than that of mulberry leaf. A dried aqueous extract of *A. lakoocha* is called Puag-Haad that has traditionally used in Thai traditional medicine for centuries. Puag-Haad and oxyresveratrol have been showed for their active role in health and disease prevention. However, the study of reducing blood glucose levels through the inhibition of α -glucosidase activity has not been conducted. Thus the present study aimed to determine the inhibitory effect of Puag-Haad and oxyresveratrol on α -glucosidase activity. The result showed that acarbose, Puag-Haad and oxyresveratrol inhibited α -glucosidase activity in a concentration-dependent manner when *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (*p*NPG) was used as a substrate. The IC₅₀ of Puag-Haad, oxyresveratrol, and acarbose were 11.18, 45.85, and 656.9 μ g/mL, respectively, indicating that oxyresveratrol has stronger α -glucosidase inhibitory activity than acarbose. Interestingly, Puag-haad is the strongest α -glucosidase inhibitor in this study. From Lineweaver-Burk plot, acarbose exhibited competitive inhibitory activity whereas Puag-Haad and oxyresveratrol showed noncompetitive inhibition. Therefore Puag-Haad and oxyresveratrol are natural compounds that should be further investigated for their potential as anti-diabetic agents.

Keywords: Diabetes mellitus, *Artocarpus lakoocha* Roxb., oxyresveratrol

A30

Hypocholesterolemic Effect of Sericin-Derived Oligopeptides in High-Cholesterol Fed Rats

Phakhamon Lapphanichayakool¹, Manote Sutheerawattananonda², Nanteetip Limpeanchob¹

¹ Department of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

² Department of Food Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Abstract

The beneficial effect of cholesterol-lowering proteins and/or peptides derived from various dietary sources is continuously reported. A non-dietary protein from silk cocoon, sericin, has also demonstrated cholesterol-lowering activity. A sericin hydrolysate prepared by enzymatic hydrolysis was also expected to possess this effect. The present study aimed to investigate the cholesterol-lowering effect of sericin peptides, so called “sericin-derived oligopeptides” (SDO) both *in vivo* and *in vitro*. The results showed that SDO at all three doses tested (10, 50 and 200 mg/kg/day) suppressed serum total and non-HDL cholesterol levels in rats fed a high-cholesterol diet as compared with high cholesterol diet group ($p < 0.05$). Triglyceride and HDL-cholesterol levels did not significantly change among all groups. The fecal contents of bile acids and cholesterol did not differ among high-cholesterol fed rats. SDO dose-dependently reduced cholesterol solubility in lipid micelles, and inhibited cholesterol uptake in monolayer Caco-2 cells. SDO also effectively bound to all three types of bile salts, *i.e.*, taurocholate, deoxytaurocholate and glycodeoxycholate. Direct interaction with bile acids of SDO may disrupt micellar cholesterol solubility, and subsequently reduce the absorption of dietary cholesterol in intestines. Taking all data together, SDO or sericin peptides exhibit a beneficial effect on blood cholesterol levels and could be potentially used as a health promoting dietary supplement or nutraceutical product.

Keywords: Sericin, hypocholesterolemic effect, cholesterol, protein hydrolysate, bile acid binding, micellar solubility

A31**Anti-adipogenesis Effect and Molecular Mechanism of *Artocarpus lakoocha* Roxb. and oxyresveratrol in Culture Adipocytes****Kanittaporn Trisat, Nanteetip Limpeanchob***Department of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand***Abstract**

Obesity is one of the risk factors of metabolic diseases such as diabetes and cardiovascular diseases. The key strategy to prevent and treat obesity is maintaining an energy balance by behavioral changing. However, it is not readily long-term persisted for most people. Searching ways, especially by using dietary supplement to prevent and/or treat obesity without changing the behavior or appearance of the favorite foods receives much attention. The present study aimed to investigate the anti-adipogenesis effect of Puag-Haad, a dried aqueous extract prepared from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb., and oxyresveratrol using 3T3-L1 adipocyte cell model. Stock solution of Puag-Haad and oxyresveratrol were prepared in 100% DMSO. The final concentration of DMSO in culture medium was 0.1%. Puag-Haad and oxyresveratrol were added to the medium at cell differentiation stages to the end of the adipogenesis process. The lipid contents in the mature adipocytes were determined using Oil Red O staining method. The result showed that both Puag-Haad (5-40 µg/mL) and oxyresveratrol (25-100 µM) inhibited lipid accumulation in a concentration-dependent manner. Puag-Haad and oxyresveratrol decreased lipid accumulation approximately 40% at the concentration of 40 µg/mL and 100 µM, respectively. This study suggested that Puag-Haad and oxyresveratrol have anti-adipogenesis effect by inhibiting lipogenesis in adipocytes. The underlying mechanisms of this effect will be further investigated.

Keywords: *Artocarpus lakoocha* Roxb., oxyresveratrol, anti-adipogenesis, obesity

A32

Neuroprotective Activity of *Artocarpus lakoocha* Roxb. Extract and Oxyresveratrol

Hasriadi, Nanteetip Limpeanchob

Department of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Abstract

Oxidative stress plays important role in pathophysiology of neurodegenerative diseases, thus antioxidant has been suggested for prevention and treatment of such diseases. *Artocarpus lakoocha* Roxb. has been used as traditional drug plant for centuries in Thailand. Aqueous extract of *A. lakoocha* known as Puag-Haad has been used for anthelmintic treatment. Previous studies revealed the potential of oxyresveratrol as a neuroprotectant. We proposed that Puag-Haad would have similar effect since the main compound of Puag-Haad is oxyresveratrol. In this present study, we examined the neuroprotective effect of Puag-Haad (containing approximately 66% oxyresveratrol) and oxyresveratrol against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced neuronal damage in SH-SY5Y cells. The preliminary study showed high antioxidant activities of these compounds tested by DPPH and FRAP assays. Puag-Haad, oxyresveratrol and trolox as a positive control showed IC₅₀ at 9.36 µg/mL, 38.14 µM, and 55.29 µM respectively. IC₅₀ of Puag-Haad based on oxyresveratrol content is 22.97 µM. For FRAP assay, the results demonstrated that oxyresveratrol and trolox at 100 µM concentration produced Fe²⁺ ions at 11.18 and 8.23 µM, respectively. Puag-Haad at 30 µg/mL (73.7 µM oxyresveratrol) produced 10.82 µM of Fe²⁺ ions. The neuroprotective effects of Puag-Haad and oxyresveratrol determined by XTT and LDH assays were observed after a short H₂O₂ treatment (4 h) but not at 24 h. Further studies are needed to investigate the effects on cellular oxidative stress.

Keywords: Puag-Haad, oxyresveratrol, neuroprotective effect, oxidative stress

A33

Preparation of *Gynura pseudochina* DC. var. *hispidia* Thv. Extract Ointment for Subacute Toxicity Test Before Clinical Trial Against Psoriasis Plaque**Boonchua Dhorranintra¹, Paveena Wongtrakul², Aranya Jutiviboonsuk³**¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand² Division of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakarn 10540, Thailand³ Division of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakarn 10540, Thailand**Abstract**

Gynura pseudochina DC. var. *hispidia* Thv. leaves have long been used effectively against Psoriasis cutaneous plaques in Thai traditional medicine. The research objectives are to prepare *Gynura pseudochina* DC. var. *hispidia* Thv. leaves extract ointment and to perform subacute toxicity test on guinea pigs' skin before proceeding to Phase II clinical trial along with the study of its mechanism of action. Dried powder of *Gynura pseudochina* DC. var. *hispidia* Thv. leaves was extracted by 95 ethanol and vacuum dried, yielding semisolid dark green substance. Ointment (0.1/1 g) was prepared and kept in a refrigerator until used. The *Gynura* extract ointment was applied on 2.5 cm² shaved skin of 12 guinea pigs once a day for 45 days and the ointment base was also applied on the 2.5 cm² shaved skin of another 8 guinea pigs of the same batch as a control group. There was no difference in all physiological parameters between two groups of the animals during and at the end of the experiment. Skin biopsy microscopic examination performed periodically during and at the end of an experiment revealed no histological change in both groups of the animals. The preparation, 0.1/1 g *Gynura* leaves extract ointment produced no abnormal reaction in this subacute toxicity test. The clinical trial and the study of mechanism of action have been further performed.

Funding for this work was provided by the Cerebos Awards Research Fund.

Keywords: *Gynura pseudochina* DC. var. *hispidia* Thv. ointment, subacute toxicity test, psoriasis, cutaneous plaques

A34

Effect of Aril Extract of *Momordica cochinchinensis* Spreng on Glucose and Fat Metabolism in High Fat and High Fructose Diet Induced Insulin Resistant Rats

Pavina Apiboon¹, Laddawan Senggunprai¹, Parichat Prajaney², Bunkerd Kongyingoes¹, Patchareewan Pannangpetch¹

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Abstract

Diabetes mellitus is a serious health problem of Thais and also worldwide population, as it cannot be radically cured. Insulin resistance is an essential cause of Type 2 diabetes. Long term high fat and high fructose diet (HFFD) consumption can cause an insulin resistance leading to hyperglycemia, glucose intolerance and dyslipidemia. This study aimed to investigate the effects of aril extract of *Momordica cochinchinensis* (MCE) on glucose and fat metabolism in HFFD-induced insulin resistant rats. Male Wistar rats were used. The rats in the normal group were fed normal chow, while those in the insulin resistant group were fed HFFD (40% lard and 20% fructose) throughout the experimental period. At week 4 of normal chow or HFFD feeding, treatments were applied for further eight weeks, as follows: Group I: normal chow with distilled water (DW); Group II: normal chow with MCE 500 mg/kg/day; Group III: HFFD with DW; Group IV-V: HFFD with MCE 250 and 500 mg/kg/day; Group VI: HFFD with pioglitazone 10 mg/kg/day. Following this, fasting blood glucose (FBG), oral glucose tolerance test (OGTT), serum insulin level, HOMA-IR, lipid profiles and expression of PPAR- α mRNA in liver were determined. The results showed that insulin resistant rats had high blood glucose and lipid levels, impaired OGTT, and high HOMA-IR value, which are the characteristics of Type 2DM. The administration of MCE (250 and 500 mg/kg) significantly decreased FBG, reduced triglyceride and improved OGTT. However, MCE only showed a prominent tendency, but not significantly, to lower HOMA-IR values in HFFD feeding rats. Interestingly, MCE significantly increased the expression of liver PPAR- α mRNA of insulin resistant rats which may contribute to the action of MCE on glucose and fat metabolism in these rats. In conclusion, MCE possesses potential to be developed as supplementary agent in the treatment of insulin resistance and Type 2 DM patients.

Keywords: *Momordica cochinchinensis*, Type 2 diabetes, insulin resistance, PPAR- α

*This work will be published as a full paper in Thai Journal of Pharmacology Vol. 39 No. 1 (2017).

A35

The Neuroprotective Effects of a Germinated Black Glutinous Rice Diet on A β ₂₅₋₃₅ Peptide Induced Learning and Memory Deficits in Male RatsGayvalin Pramoolsilpa¹, Sutisa Nudmamud-Thanoi^{2,3} and Onrawee Khongsombat^{1,3}¹*Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand*²*Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand*³*Center of Excellence in Medical Biotechnology, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand***Abstract**

Germinated black glutinous rice (GBGR) is a black glutinous rice (BGR) that has been soaked in water to initiate pre-germination. It is also known as pre-germinated brown rice (PGR). Most nutrients in GBGR are γ -aminobutyric acid (GABA), γ -oryzanol, and another bioactive lipid. GABA concentrations in GBGR are more than 15 times greater than in non-germinated. PGR was being reported to have neuroprotective effects in developing rats, against the accumulation of lead and protects against neuronal cell loss and memory deficits, but there are no report regarding GBGR, for example. In our research, we investigated the effects and protective mechanisms of A β ₂₅₋₃₅ peptides in GBGR against glutamate-induced excitotoxicity. In our *in vivo* studies, rats were injected with 15 μ l of aggregate A β ₂₅₋₃₅ peptides following screening of the effects on locomotor activities by open field test. Spatial navigation and recognition memories were evaluated by the Morris water maze and novel object recognition test, following which the glutamate and GABA concentrations were analyzed by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Finally, the neuronal viability was counted by histological techniques. The results showed that the rats given GBGR had significantly increased spatial and recognition memories by the increase of GABA concentration and in the hippocampus. Moreover, GBGR shown neuronal viability as the control rat. It can be concluded that GBGR has a potential role to protect against memory deficits in an Alzheimer's rat model.

Keywords: Alzheimer's disease; A β ₂₅₋₃₅ peptide; learning and memory; GABA; pre-germinated black glutinous rice

*This work will be published as a full paper in Thai Journal of Pharmacology Vol. 39 No. 1 (2017)

Address correspondence and reprint request to: Asst. Prof. Onrawee Khongsombat, Ph.D. Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000. Thailand. E-mail address: onraweek@nu.ac.th

กิติกรรมประกาศ

สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย และคณะกรรมการจัดงานฯ

ขอขอบพระคุณ

ผู้ให้การสนับสนุนการจัดประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 39

วันที่ 18-20 พฤษภาคม 2560

บริษัท ไทยโอซูก้า จำกัด	บริษัท เมอร์ค จำกัด
บริษัท เคมิเคิล เอ็กซ์เพรส จำกัด	บริษัท ไทยนครพัฒนา จำกัด
บริษัท เพอร์กินเอลเมอร์ จำกัด	ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอ็น. วาย. อาร์
บริษัท เอส.เอ็ม. เคมีคอล ซัพพลาย จำกัด	บริษัท เมทเลอร์-ทอเลโด (ประเทศไทย) จำกัด
บริษัท รัชมอร์ พีริซิชั่น จำกัด	ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอส สแคว เอ็นเตอร์ไพรส์
World Courier Asia (Thailand) Co., Ltd	บริษัท กิ๊ปไทย จำกัด
สมาคมผู้ผลิตเครื่องดื่มให้พลังงาน	ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน)
บริษัท เอ็นบีดี เฮลท์แคร์ จำกัด	บริษัท พาราไซแอนติฟิค จำกัด
บริษัท โรด้าลาบอเรททอรีส์ จำกัด	บริษัท ถ้วยทองโอเอส จำกัด
บริษัท เน็ค ทู สเต็ปส์ จำกัด	บริษัท เอสโค โลฟไซเอนซ์ (ประเทศไทย) จำกัด
บริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด	บริษัท แอปพลาย เคมีคอล แอนด์ อินสตรูเมนต์ จำกัด


Thai Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.


MERCK


ChemEx


บริษัท ไทยนครพัฒนา จำกัด


PerkinElmer®
For the Better


AVR


S.M. CHEMICAL
S.M. CHEMICAL SUPPLIES CO., LTD.


METTLER TOLEDO


RUSHMORE
PRECISION CO., LTD.


S-SQUARE
Enterprise Ltd


AC
Applied Chemical & Instrument


ESCO


World Courier®
AmerisourceBergen


gibthai
A THAI HOLDING COMPANY


SCB
ไทยพาณิชย์


nbd
healthcare


Bara Scientific
Solution of Success


Roche
Diagnostics


Rota


GOLDEN CUP
with over 60 years of trust



BPL

กรุงเทพ พยาธิ-แลป

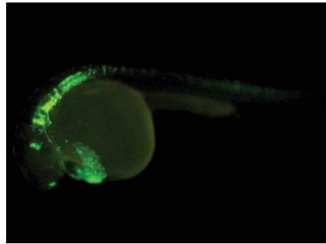
Professional Services Meet International Standards

ISO 15189 และ ISO 15190

Tel. 02 619 2909 Website: www.bpl.co.th

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



DP73+BX63+PC



Confocal Laser Scanning Microscope

FV3000

FLUOVIEW



402 Soi Jarunsanitwong 66/1, Jarunsanitwong Rd., Bangplad, Bangkok 10700. Tel 02-883-5081-5, Fax. 02-883-5060, Mobile. 081-6335092

Hollywood International Ltd.

บริษัท ฮอลลิวูด อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด เป็นตัวแทนจำหน่ายกล้องจุลทรรศน์ Nikon และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ชั้นนำจากต่างประเทศ สำหรับงานวิจัยทางด้าน Stem Cells, Cancer Research, Tissue Engineering, Molecular Pathology, Animal Model Research, Molecular Imaging เป็นต้น



Cell Incubator & Processing System

Animal Model Research



Stereotaxis Instruments



Molecular Imaging



Animal Behavior Observation



Oxygen monitoring

Living Cell & Stem Cell Research



Cancer Research : CTC selection



**Tissue Engineering :
Bioreactor & Microfluidic**



อภิพนธ์ทนาการจาก ภก.สวัสดี ดอนสกุล
บริษัท โอเร็กซ์ เทรดดิ้ง จำกัด

from *CONCEPT*
To *REALITY*

**Pharma
Nueva**



A Contract
Research
Organization (CRO)
Specialized in pharmaceuticals and related fields

Services :

- Preformulation Testing
- Formulation Development
- Bioequivalence Study
- Analytical Method Development
- Analytical Method Validation
- Bioanalytical Method Development
- Bioanalytical Method Validation
- Quality Control Testing
- Stability Testing

Vision

“ To be a leading **CRO** on pharmaceutical / nutraceutical product development and services that meet international standards ”



ISO/IEC 17025
DRUG IN PLASMA

ISO 9001 : 2008

Approved by Ministry of Finance
as research and development organization

www.pharmanueva.com

171/3 Soi Chokechai Ruammitr, Vibhavadi Rangsit Road, Bangkok, Thailand 10900 Tel : + 66 (0) 2625 9690, + 66 (0) 8 4751 9825 Fax : + 66 (0) 2276 1543