ผลของสารสกัดจากรางจืดต่อเซลล์ม้ามของหนูขาวโดยวิธีฟูเรียทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโตรสโคปี

นายวีระชัย เตชะกิตติโรจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-5682-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T 216568CC

THE EFFECT OF RANG JUED (*THUNBERGIA LAURIFOLIA LINN.*) EXTRACT ON RAT SPLENOCYTES BY FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY

Mr. Veerachai Techakitiroj

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Pharmacy in Pharmacology
Department of Pharmaceutical Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-17-5682-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดจากรางจืดต่อเซลล์ม้ามของหนูขาวโดยวิธีฟูเรียทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโตรสโคปี
โดย	นาย วีระชัย เตชะกิตติโรจน์
ภาควิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. พาลาภ สิงหเสนี ตันติยาสวัสดิกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นายสัตวแพทย์ ทรงพล ชีวะพัฒน์ ดร. รัตนา สินธุภัค

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ศิริภรณ์ ฟุ้งวิทยา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. พาลาภ สิงหเสนี ตันติยาสวัสดิกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(นายสัตวแพทย์ ทรงพล ชีวะพัฒน์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณ์มงคล)

..... กรรมการ

(เรืออากาศโท ดร. ธีรยุทธ สุระมานะ)

นายวีระชัย เตชะกิตติโรจน์ : ผลของสารสกัดจากรางจืดต่อเซลล์ม้ามของหนูขาวโดยวิธีฟูเรีย ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโตรสโคปี. (THE EFFECT OF RANG JUED (THUNBERGIA LAURIFOLIA LINN.) EXTRACT ON RAT SPLENOCYTES BY FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY) อ.ที่ปรึกษา รศ. ดร. พาลาภ สิงหเสนี, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. รัตนา สินธุภัค, น.สพ. ทรงพล ชีวะพัฒน์; จำนวนหน้า 63 หน้า. ISBN 974-17-5682-8

ความเข้าใจในการเปลี่ยนแปลงหน้าที่และโครงรูปของโปรตีนของสัตว์ทดลองได้รับสารต่างๆทางเภสัชภัณฑ์มีความสำคัญอย่างยิ่งในการสืบค้นพิษและความผิดปกติที่มีหลักฐานในมนุษย์และสัตว์ Sindhupak และคณะ (2003) รายงานว่าวิธีฟูเรียทรานสฟอร์ม อินฟราเรด (FTIR) สเปคโตรสโคปีมีข้อดีโดยใช้เวลาน้อยและราคาไม่แพง (ไม่ต้องผ่านขั้นตอนของการ fixation และ การย้อมสี) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีนนั้น Rice-Evans และคณะ (1991) ได้รายงานว่า FTIR สเปคโตรสโคปี เป็นเทคนิคที่ดีอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเกิดจากอิทธิพลโดยการเปลี่ยนแปลงโครงรูป unfolding และ alpha-helical ของ chromatophore ซึ่ง FTIR ถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบคุณสมบัติของโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนโดย FTIR สามารถให้ข้อมูลทั้งหมดและ รายละเอียด ของ functional group ของโปรตีนในการทำหน้าที่ต่างๆ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการประยุกต์การใช้ FTIR เพื่อศึกษาม้ามของหนูที่ได้รับรางจืดโดยพิจารณาข้อมูลร่วมกับผลทางชีวเคมีและโลหิตวิทยาโดยกลุ่มผู้วิจัยทำการทดสอบพิษ เฉียบพลันและพิษเรื้อรังเมื่อพิจารณาร่วมกับการทดสอบพิษต่อม้ามของหนูที่ได้รับสารสกัดน้ำของรางจืด

พบว่ามีการเคลื่อนของเลขคลื่น (FTIR spectra) ในบริเวณ amide I ในหนูที่ได้รับรางจืด (8000 mg/kg) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (control rats) และ มีการเพิ่มขึ้นของระดับบิลิรูบิน (bilirubin) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เกิดจาก heme oxygenase enzyme ที่มีความสำคัญในการสลาย heme เป็น biliverdin คาร์บอนมอนนอกไซด์ และเหล็กที่มีวาเลนซี2 มีฤทธิ์ในการป้องกันและปรับ (adaptive) ต่อผลจากความเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) รวมทั้ง nitrosative stress (Foresti และ คณะ, 2003)

ผู้วิจัยเสนอว่ากลไกการออกฤทธิ์ของรางจืดเกี่ยวข้องกับ ferric-nitrosyl heme oxygenase complex เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงเลขคลื่นประมาณ 5 cm^{-1} โดยรางจืดสามารถลดการเปลี่ยนแปลงจาก nitrosative stress สังเกตจากการสั่นของ amino acid side chain ด้านในของโปรตีน

แนวคิดของกลไกการแก้พิษของรางจืดผ่านทาง heme oxygenase โดยอาจใช้เป็นแนวทางการศึกษาผลของ heme ซึ่งสัมพันธ์กับเซลล์และความเครียดของกล้ามเนื้อในแง่ที่รางจืดอาจใช้เป็นยาแก้พิษสำหรับสารประกอบสารหนูซึ่งกลุ่มผู้วิจัยเคยได้ทดสอบแล้วพบว่า apigenin ซึ่งเป็นสาระสำคัญในรางจืดสามารถยับยั้งพิษของสารหนูในการเปลี่ยนการควบคุม (deregulation) ของ stress fiber ได้

ภาควิชา เภสัชวิทยา
สาขาวิชา เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา 2547

ลายมือนักศึกษา.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4476616733: MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORD: FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY / FTIR / SPLENOTOXICOLOGY

VEERACHAI TECHAKITIROJ: THE EFFECT OF RANG JUED (THUNBERGIA LAURIFOLIA LINN.) EXTRACT ON RAT SPLENOCYTES BY FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY. THESIS ADVISOR ASSOC. PROF. PALARP SINHASENI. Ph.D., THESIS COADVISOR : RATANA SINDHUPHAK. Ph.D., SONGPON CHIVAPAT. D.V.M., MS. (Pathobiology). 63 pp. ISBN 974-17-5682-8

Understanding functional and conformational changes of protein after treatment of experimental animal with various pharmaceutical agents has great significance for toxicological investigations of human and veterinary medicine. Sindhuphak *et al.* (2003) reported that the Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy was less time-consuming and inexpensive (due to lack of fixation and staining needed), Rice-Evans *et al.* (1991) studied protein structural modifications and proposed that FTIR spectroscopy was a well-established technique for study of protein structural modifications which provide new findings which reveal and important information.

In this study, we applied FTIR to study spleen of rat exposed to water extract of Thunbergia laurifolia in conjunction with routine biochemical and hematological parameters assays. It was found that FTIR spectra at amide I in spleen of rats exposed water extract of Thunbergia laurifolia significantly shifted as compared to control rats. This finding is in agreement with bilirubin protective effects against a nitrosative stress as earlier proposed by Foresti *et al* (2003). Since Ferric-nitrosyl heme oxygenase complex possibly reflect in bond vibration detected by FTIR 5 cm^{-1}, characterized by lower and broader complex. These patterns allow a greater degree of ligand conformational freedom resulted in changes in amide one vibration of amino acid side chain inside the protein (Wang *et al.*, 2003).

The proposed of action of Thunbergia laurifolia through heme oxygenase may be adaptive response to dopamine like action of water extract of Thunbergia laurifolia earlier resported by Thonrsaard and Marsden, 2002).

The mechanistic understanding of signaling through nitrosative stress in modulation of rat adaptive response should be further investigated to explain widely known antidote effects of Thunbergia laurifolia.

Department Pharmacology

Filed of study Pharmacology

Academic year 2004

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตร์มหาบัณฑิตนี้ ข้าพเจ้าได้เรียนรู้วิธีการคิดตั้งคำถามและตอบคำถามเชิงวิทยาศาสตร์ ข้าพเจ้ารู้สึกทราบ ซึ้งและขอพระขอบคุณบุคคลดังต่อไปนี้

อันดับแรกและโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอย่างสูงสำหรับอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. พาลาภ สิงหเสนี ในความช่วยเหลือ เอาใจใส่ และ การช่วยเหลือในการพัฒนางานชิ้นนี้ ยิ่งกว่านี้ท่านอาจารย์ยังได้ให้การชี้แนะแนวความคิดที่หาค่ามิได้ให้แก่ข้าพเจ้าในการเป็นนักพิษวิทยาที่ดีจากการคำแนะนำที่ของท่านอาจารย์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอย่างสุดซึ้งสำหรับความพยายามอย่างสูงในคำแนะนำที่หาค่ามิได้แนวคิดต่างๆ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณอย่างสูงสำหรับอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. รัตนา สินธุภัค สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ นายสัตวแพทย์ ทรงพล ชีวะพัฒน์ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการเตรียมความพร้อมอย่างดีเยี่ยมในห้องปฏิบัติการและสำหรับความพร้อมและยินดีที่จะช่วยเหลือข้าพเจ้า วิทยานิพนธ์นี้มีสามารถสำเร็จได้ถ้าขาดท่านอาจารย์ทั้งสอง

ข้าพเจ้าขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งศาสตราจารย์ นายแพทย์ นิกร ดุสิตสิน สำหรับความกรุณาของท่าน

ข้าพเจ้าขอขอบคุณสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ และ เจ้าหน้าที่สำหรับความกรุณาของท่านและช่วยเหลือและความสะดวกอีกทั้งคำชี้แนะต่างๆ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ดร.ธีรยุทธ สุระมานะ ดร.ทิพิชา โปษยานนท์ ภญ.นพรัตน์ นันทรัตนพงษ์ คุณศศิธร แจ่มถาวร คุณศุธฤทัย เชิญขวัญมา ผู้ที่ควยช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือต่างๆ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญรูปภาพ.....ญ

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 5

สมมุติฐาน 5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รางจืด 6

ม้าม 13

Red pulp 15

White pulp 16

อินฟาเรดสเปกโทรสโกปี 18

กระบวนการดูดกลืนแสงอินฟาเรด (The Infrared Absorption Process) 20

แบบต่าง ๆ ของการสั่นและการงอ (Types of Vibration and Bending) 21

ส่วนประกอบของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

(IR Spectrophotometer Components) 24

แบบต่าง ๆ ของเครื่องอินฟาเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ 29

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง 35
สารเคมี 35
วิธีทำการทดลอง 35
การทดสอบผลเฉียบพลันของสารสกัดรางจืดที่มีผลต่อม้ามของหนู 37
การทดสอบผลการได้รับสารแบบกึ่งเรื้อรังของสารสกัดรางจืดที่มีผลต่อม้ามของหนู 39
ขั้นตอนการคัดแยกเซลล์ม้าม 40
การเตรียมเซลล์ม้าม 41
การวิเคราะห์ FTIR 42
อุปกรณ์ 43
สารเคมี 44
ขั้นตอนการตรวจสอบจุลพยาธิของม้าม 44
ขั้นตอนการเตรียมเลือด 45
การวัด Bilirubin ,AST,ALT 45
ปัญหาทางจริยธรรม 45
การวิเคราะห์ทางสถิติ 45

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดสอบผลเฉียบพลันของสารสกัดรางจืดที่มีผลต่อหนู . 46
ผลการทดสอบผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดรางจืดที่มีผลต่อหนู 54

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย 55

รายการอ้างอิง 59

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 64

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงช่วงต่างๆของอินฟาเรดสเปกตรัม 20

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของน้ำหนักม้ามต่อน้ำหนักตัว (Mean ± S.E.). 46

ตารางที่ 3.ระดับของ Total Bilirubin (Mean ± S.E.) 47

ตารางที่ 4 ระดับ AST (Mean ± S.E.) 48

ตารางที่ 5 ระดับ ALT (Mean ± S.E.) 49

ตารางที่ 6 ระดับ White Blood Cells (Mean ± S.E.) 50

ตารางที่ 7 ระดับของเปอร์เซนต์ Lymphocyte (Mean ± S.E.) 51

ตารางที่ 8 จุลพยาธิวิทยาของม้ามหนู 52

ตารางที่ 9 Wavenumber ของ Amide I bond (Mean ± S.E.) 53

ตารางที่ 10 อัตราส่วนของน้ำหนักม้ามต่อน้ำหนักตัวหนู (Mean ± S.E.) 54

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงสัณฐานวิทยาของรางจืด 7
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ Apigenin 8
รูปที่ 3 แสดงรูปจุลกายวิภาคของม้าม 15
รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงความยาวระหว่างอะตอมที่เกิดพันธะ 22
รูปที่ 5 การเกิดการเปลี่ยนแปลงมุมระหว่าง 2 พันธะ 23
รูปที่ 6 แสดงแผนภาพองค์ประกอบของเครื่องอินฟาเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ 24
รูปที่ 7 แสดงลักษณะของอินฟาเรดสเปกตรัมของโพลีสไตรีน (Polystyrene) 29
รูปที่ 8 แผนภาพแสดงลักษณะการออกแบบเครื่องอินฟาเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ชนิดลำแสงคู่ 30
รูปที่ 9 แผนภาพแสดงลักษณะการออกแบบเครื่องอินฟาเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ชนิดลำแสงคู่อีกแบบหนึ่ง 30
รูปที่ 10 ไดอะแกรมสาธิตการหา resolution โดยการหน่วง interferometer 33
รูปที่ 18.อัตราส่วนของน้ำหนักม้ามต่อน้ำหนักหนู 51