

| | | |
|----------------------------------|--|------------|
| Thesis Title | Effects and Mechanism of Silibinin on Toxicity of α -Amanitin in <i>In Vitro</i> | |
| Author | Miss Aunjana Khunnala | |
| Degree | Master of Science (Toxicology) | |
| Thesis Advisory Committee | | |
| | Prof. Paitoon Narongchai, M.D. | Advisor |
| | Assoc. Prof. Siripun Narongchai | Co-advisor |
| | Dr. Sirisak Butkrachang | Co-advisor |
| | Dr. Donrawee Leelarungrayub | Co-advisor |

ABSTRACT

Alpha amanitin (α -amanitin) is a powerful natural hepatotoxin which is the most poisonous substance of amatoxins and cause dramatic toxic consequences mainly within the liver and kidney. Its mechanism toxicity is inhibition of RNA polymerase II leading to the inability in producing mRNA and consequently causing cell death within 24 hour. In addition, α -amanitin might stimulate the generation of reactive oxygen species (ROS) and lead to severe α -amanitin hepatotoxicity. At present, there is no available antidote for amatoxin poisoning but the most effective clinical antidote is silibinin. Silibinin is a polyphenolic flavonoid, which has been reported to have a wide range of hepatoprotective effects. The scavenging free radicals such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (OH \cdot) and hydrogen peroxide (H_2O_2) of silibinin were evaluated in this study by demonstrating in xanthine oxidase-

hypoxanthine (XOD-HPX), deoxyribose and 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)/Horseradish peroxidase (ABT/HRP) systems and compared to N-acetylcysteine (NAC), gallic acid and quercetin *in vitro*. The toxic effects of toxins in human blood were studied by determination of malondialdehyde (MDA) which detected with thiobarbituric acid reactive substance (TBARs) assay and activity on glutathione (GSH) which detected with 5,5' dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) method. In addition, we investigated the direct action of silibinin on α -amanitin by high performance liquid chromatography (HPLC).

Silibinin could scavenge $O_2^{\cdot -}$ lower than quercetin but higher than gallic acid and NAC. It scavenged OH better than quercetin, NAC and gallic acid, respectively. Silibinin was the most inactive scavenging agent for H_2O_2 compared with other antioxidant used. Silibinin has the highest activity on $O_2^{\cdot -}$ than H_2O_2 and OH, respectively. α -Amanitin significantly increased MDA and decreased GSH level. The co-treatment of silibinin (concentration 4.32 and 8.54 μ g/ml) with α -amanitin (25 μ g/ml) resulted in significant decreased in MDA and increased GSH level. The standard curve of α -amanitin and silibinin of HPLC method provided good linearity ($r = 0.9994$) with the precision less than 8% and the accuracy more than 90%. After incubation of silibinin with α -amanitin the results showed no different change when compared to the untreated α -amanitin.

The present study suggests that silibinin exerts antioxidant activity as free radicals scavenging. Silibinin also inhibits lipid peroxidation and protects GSH in human blood from α -amanitin oxidation. Although silibinin has a wide range of mechanism actions properties, it may not interact directly on α -amanitin *in vitro*.

| | | |
|--------------------------------|--|----------------------|
| ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ | ฤทธิ์และกลไกของซิลิบินินต่อการเป็นพิษของแอลฟา-อะมานิทินในหลอดทดลอง | |
| ผู้เขียน | นางสาวอัญญา คุณณะลา | |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พิษวิทยา) | |
| คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | ศาสตราจารย์นายแพทย์ไพฑูริย์ ณรงค์ชัย | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| | รองศาสตราจารย์สิริพันธ์ ณรงค์ชัย | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | ดร. ศิริศักดิ์ บุตรกระจำง | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | ดร. ดลรวี ลีลารุ่งระชัย | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

บทคัดย่อ

แอลฟา-อะมานิทินเป็นสารธรรมชาติที่มีความเป็นพิษรุนแรงต่อตับ ซึ่งความเป็นพิษนี้ถือว่ามากที่สุดในกลุ่มของอะมาท็อกซิน และทำให้เกิดความเป็นพิษอย่างเด่นชัดต่อตับและไต กลไกการเกิดพิษคือยับยั้งการทำงานของ RNA polymerase II ทำให้ขาดความสามารถในการสร้าง mRNA และผลที่ตามมาทำให้เกิดการตายของเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้แอลฟา-อะมานิทินอาจกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจนและทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับรุนแรงขึ้น ในปัจจุบันนี้ ยังไม่มี antidote สำหรับการรักษาความเป็นพิษจากอะมาท็อกซิน แต่การรักษาทางคลินิกที่ได้ผลดีที่สุดคือซิลิบินิน ซิลิบินินเป็นสารพอลิฟีนอลชนิดฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีรายงานผลในการป้องกันการทำลายตับอย่างกว้างขวาง จากคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ superoxide anion (O_2^-) hydroxyl radical (OH^\cdot) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ในงานวิจัยครั้งนี้อาศัยวิธี xanthine oxidase-hypoxanthine (XOD-HPX) deoxyribose และ 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)/Horseradish peroxidase (ABT/HRP) เปรียบเทียบผลของซิลิบินินกับ N-acetylcysteine (NAC), gallic acid และ quercetin ในหลอดทดลอง ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารพิษในเลือดคนโดยวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) โดยวิธี thiobarbituric acid reactive substance (TBARs) และวัดปริมาณ glutathione (GSH) โดยวิธี 5,5' dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) นอกจากนี้ยังศึกษาว่าซิลิบินินมี

ความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อแอลฟา-อะมานิตินโดยตรงหรือไม่ โดยใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

ผลการทดลองพบว่าการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด O_2^- ของซิลิบินินน้อยกว่า quercetin แต่สูงกว่า gallic acid และ NAC ซิลิบินินสามารถกำจัด OH^\cdot ได้ดีกว่า quercetin NAC และ gallic acid ตามลำดับ แต่ซิลิบินินมีความสามารถในการกำจัด H_2O_2 ได้น้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น สรุปได้ว่าซิลิบินินมีความสามารถในการกำจัด O_2^- มากกว่า H_2O_2 และ OH^\cdot ตามลำดับ การศึกษาต่อมาพบว่าแอลฟา-อะมานิตินทำให้ปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นและทำให้ปริมาณ GSH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเติมซิลิบินิน (ความเข้มข้น 4.32 และ 8.54 $\mu\text{g/ml}$) ลงไปพร้อมกับแอลฟา-อะมานิติน ผลการทดลองพบว่าสามารถลดปริมาณของการเกิด MDA และเพิ่มปริมาณของ GSH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กราฟมาตรฐานของแอลฟา-อะมานิตินและซิลิบินิน โดยวิธี HPLC นั้นให้ความเป็นเส้นตรงที่ดี ($r = 0.9994$) โดยมีค่าความเที่ยงน้อยกว่า 8% และค่าความแม่นยำมากกว่า 90% ซึ่งอยู่ในค่าที่ยอมรับได้ หลังจากนำซิลิบินินมาผสมกับแอลฟา-อะมานิตินแล้วนำไปหาปริมาณ พบว่าปริมาณของแอลฟา-อะมานิตินและซิลิบินินไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีเฉพาะแอลฟา-อะมานิตินเพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าซิลิบินินแสดงคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ซิลิบินินยังสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidtion และป้องกัน GSH ในเลือดคนจากการเกิดความเป็นพิษของแอลฟา-อะมานิตินได้ ถึงแม้ว่าซิลิบินินจะมีกลไกการทำงานที่หลากหลาย แต่ซิลิบินินก็ไม่สามารถที่จะออกฤทธิ์โดยตรงต่อแอลฟา-อะมานิตินได้