

<b>Thesis Title</b>	Comparative Effects of Medicinal Plant Extracts on Prevention of Oxidative Stress-induced Lysis in Red Blood Cells	
<b>Author</b>	Miss Narunan Wuttisin	
<b>Degree</b>	Master of Science (Biochemistry)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Lect. Dr. Udompun Khansuwan	Chairperson
	Lect. Dr. Somdet Srichairatanakool	Member

#### ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) contribute to the pathogenesis of several hereditary disorders of red blood cells (RBCs), including thalassemia. Thalassemia patients are subjected to depletion of lipid-soluble antioxidants and peroxidative tissue injury by the secondary iron overload. Oxidative damage of  $\beta$ -thalassemia RBCs is increased due to the excessive  $\alpha$ -globin chain, excessive iron and less developed antioxidant defense systems. Such RBC is hemolyzed more easily than normal RBC when exposed to many oxidizing agents.

This work was aimed to investigate the protective effects of medicinal plant extracts such as green tea, black tea, tamarind seed coat and *Cissus quadrangularis* Linn compared with vitamin C against oxidative stress-induced lysis of RBCs *in vitro*. Medicinal plants were extracted with hot water (80°C) at a concentration of 1 mg/ml and evaluated for antioxidant activity using trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) test. The extracts were also evaluated for their anti-hemolytic effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced normal and  $\beta$ -thalassemic RBCs. It was found that TEAC values of the tamarind seed coat extract (*T. indica*) exhibited the highest antioxidant capacity followed by vitamin C, green tea, black tea and *C. quadrangularis*. The range of IC<sub>50</sub> of tamarind seed extract was less than those of IC<sub>50</sub> of vitamin C, green tea, black tea and *C.*

*quadrangularis* extracts in both normal and thalassemic RBCs. Results are consistent with the relation of the antioxidant activities of medicinal plant extracts.

The protective effect against oxidative damage was determined by pre-incubating RBC from normal volunteers, from splenectomized and non-splenectomized  $\beta$ -thalassemia patients with medicinal plant extracts or vitamin C at a final concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$  for 2 hours, then challenged with hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) at indicated time. ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  influx were measured by flow cytometry, lipid peroxidation was determined by thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) assay, reduced glutathione (GSH) was spectrophotometrically measured. In addition the calmodulin response of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in RBCs were also determined by the coupled enzyme method. It was found that medicinal plant extracts and vitamin C protected RBCs against oxidative damage by decreasing malondialdehyde (MDA) production and increasing GSH content. The medicinal plant extracts also reduced the ROS formation and  $\text{Ca}^{2+}$  influx in both normal and thalassemic RBCs effectively. Moreover the calmodulin response of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in RBCs was also recovered.

In conclusion, the medicinal plant extracts have a powerful antioxidant activity *in vitro* and could capable of protecting fresh isolated normal and thalassemic RBCs against oxidative damage.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลเชิงเปรียบเทียบของสารสกัดจากสมุนไพรรักษาป้องกันเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกจากภาวะออกซิเดทีฟสเตรส	
ผู้เขียน	นางสาวณันท์ วุฒิสินธุ์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ. ดร. อุดมภักดิ์ ขาลสุวรรณ	ประธานกรรมการ
	อ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

อนุมูลอิสระมีส่วนก่อให้เกิดพยาธิสภาพกับโรคผิดปกติทางพันธุกรรมหลายอย่างของเม็ดเลือดแดง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยทาลัสซีเมีย ซึ่งทำให้มีการลดต่ำลงของสารแอนติออกซิเดนท์กลุ่มที่ละลายได้ในไขมันและมีการทำลายเนื้อเยื่อจากภาวะเหล็กเกิน เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยทาลัสซีเมียชนิดเบต้าที่มีการออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้นมีสาเหตุมาจากส่วนเกินของสายแอลฟาโกลบินที่ไม่มีคู่เหมาะสมให้จับ การมีธาตุเหล็กสะสมเพิ่มมากขึ้นและการมีระบบต้านออกซิเดชันลดลง เม็ดเลือดแดงเหล่านี้จะแตกตัวง่ายกว่าปกติเมื่อได้รับสารออกซิเดนท์เข้าไป

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจวัดผลในหลอดทดลองของสารสกัดสมุนไพรรักษา ได้แก่ สารสกัดจากชาเขียว ชาดำ เปลือกเมล็ดมะขาม และเพชรสังฆาต เปรียบเทียบกับวิตามินซี ต่อการป้องกันการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารออกซิเดนท์ โดยการนำสมุนไพรรักษาสกัดด้วยน้ำร้อนให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววัดค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) จากนั้นจึงนำเม็ดเลือดแดงของคนปกติและเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบต้าทาลัสซีเมียที่ได้รับการตัดม้ามและไม่ได้ตัดม้ามมาบ่มด้วยสารสกัดสมุนไพรรักษา ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นให้เกิดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือวิตามินซี สารสกัดจาก

ชาเขียว ชาดำ และเพชรสังฆาต ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดสมุนไพรสามารถช่วยป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงของคนปกติและผู้ป่วยเบต้าทาลัสซีเมียที่เหนียวน้ำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ จากการศึกษาการป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดง 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือ วิตามินซี สารสกัดจากชาเขียว ชาดำ และเพชรสังฆาต โดยผลที่ได้จะสอดคล้องกับค่าการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพร

ในทำนองเดียวกันเมื่อทดลองบ่มเม็ดเลือดแดงของคนปกติและของผู้ป่วยทาลัสซีเมียที่ได้รับการตัดม้ามและไม่ได้รับการตัดม้ามด้วยสารสกัดสมุนไพรหรือวิตามินซีที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปวัดการเกิดอนุมูลอิสระและปริมาณแคลเซียมในเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี Flow cytometry วัดปริมาณสาร malondialdehyde (MDA) ด้วยวิธี thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) วัดปริมาณสาร reduce glutathione ด้วยวิธี Spectrophotometry และวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase บนพลาสมาเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี coupled enzyme ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดสมุนไพรสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระและลดปริมาณแคลเซียมในเม็ดเลือดแดงของคนปกติและของผู้ป่วยทาลัสซีเมียได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยป้องกันเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยทาลัสซีเมียจากภาวะออกซิเดทีฟสเตรสได้โดยทำให้ปริมาณ MDA ลดลงและระดับ reduce glutathione เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังสามารถช่วยป้องกันเอนไซม์  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase บนพลาสมาเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงจากการทำลายโดยอนุมูลอิสระได้

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดสกัดสมุนไพรมีศักยภาพในการป้องกันการเกิดออกซิเดทีฟสเตรสในเม็ดเลือดแดงได้ในหลอดทดลอง