

# อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2555B059



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ลดการทำลายตับของสารสกัดจากหญ้าดอกขาวต่อภาวะตับอักเสบจากแอลกอฮอล์ในหนูทดลอง

Attenuation on liver damages of *Vernonia cinerea* extracts in alcohol-induced hepatitis rats



คงะผู้วิจัย  
ผศ.ดร. มงคล ประพุตติบดี

สังกัด  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา และผู้ช่วยวิจัย ทุกท่านที่เกี่ยวข้องในโครงการวิจัยนี้จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และหน่วยปฏิบัติการวิจัย เภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินการไปได้จนสำเร็จคล่องด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2555



## บทคัดย่อ

หญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less) พืชสมุนไพรท้องถิ่นที่พบทั่วไปในประเทศไทยมีการนำมาใช้ในตำรับยาพื้นบ้านต่างๆ สารสกัดหญ้าดอกขาวพบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย รวมถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โรคตับจากแอลกอฮอล์เป็นหนึ่งในปัญหาสุขภาพและสาเหตุของ การเสียชีวิตทั่วโลก เกิดจากการได้รับเอทานอลในขนาดสูงติดต่อกันเป็นเวลานาน สารพิษและอนุมูลอิสระที่มาจากการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ตับและกระบวนการอักเสบ การศึกษานี้มุ่งทดสอบ ฤทธิ์ลดการ ทำลายตับของสารสกัดหญ้าดอกขาวและผลของสารสกัดต่อการสร้างอนุมูลอิสระในการตับอักเสบจากเอทานอล หนูขาวในญี่ปุ่น (Sprague-Dawley) ได้รับเอทานอลขนาด 6 กรัม/กิโลกรัม/วัน ติดต่อกัน 60 วัน เมื่อ เจ้าวัตรดับเอนไซม์เกี่ยวข้องกับตับพบว่ามีระดับเอนไซม์ alanine transaminase (ALT) และ aspartate transaminase (AST) พぶว่ามีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับ กลูโคสในปริมาณพลงงานเทียบเท่ากัน ซึ่งบ่งชี้ภาวะตับอักเสบจากเอทานอล เมื่อให้สารสกัดหญ้าดอกขาวใน น้ำขนาด 125, 250, 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม กับหนูที่เกิดตับอักเสบร่วมกับการได้รับเอทานอลต่อเนื่องอีก 45 วัน พぶว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถลดระดับของ ALT และ AST ในได ดีและเมื่อทดสอบผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้างอนุมูลอิสระ โดยทำการวัดหาปริมาณสาร malonidehyde (MDA) ด้วยวิธี TBAR assay พぶว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวในทุกขนาด สามารถลดการสร้าง MDA ในไขมันจากตับหนูที่เกิดภาวะตับอักเสบจากเอทานอลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ กลุ่มหนูมีภาวะตับอักเสบและไม่ได้รับสารสกัด เมื่อทดสอบความเป็นพิษเดียบพลันของสารสกัดหญ้าดอกขาว ในน้ำยืนยันได้ว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาดสูง (5000 มิลลิกรัม) ไม่เกิดพิษต่อหนูขาวปกติและหนูที่มีภาวะ ตับอักเสบจากเอทานอล การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวมีความปลอดภัย มีฤทธิ์ในการลด การสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลลดการทำลายตับในภาวะตับอักเสบจากแอลกอฮอล์ สารสกัดหญ้าดอกขาวจึงมี แนวโน้มที่จะนำไปใช้เป็นสารป้องกันตับในระดับคลินิกต่อไป

## Abstract

*Vernonia cinerea* Less (VE), a local herb commonly found in Thailand, has been used in many folk remedies. VE extracts have showed various pharmacological effects including anti-inflammatory and antioxidant properties. Alcoholic liver disease (ALD) is one major cause of public health problems and death worldwide. ALD is resulted from a long term expose to excessive alcohol. Toxic metabolites and free radicals produced from alcohol metabolism cause liver cells injury and induce chronic inflammation. The study aims to investigate attenuation of liver damages and possible mechanism of action on free radical production of VE water extracts on ethanol-induced hepatitis. Male Sprague-Dawley rats were received 6 g/kg/day alcohol for 60 days. Liver function enzymes: alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in plasma were measured. The enzymes; ALT and AST were increased significantly when compared to the control rats or isocaloric equivalent-glucose rats, indicating a stage of alcoholic hepatitis. The alcohol induced hepatitis rats were received VE extract (125, 250, 500 mg/kg) for another 45 days. Our results showed that 500 mg/kg VE extract was significant attenuated the ALT and AST enzymes. Free radical productions in liver microsomes were measured as malonidehyde (MDA) production by TBAR assay. VE extracts at all doses reduced the MDA significantly, compared to the hepatitis rats. Acute toxicity of single dose VE extract (5000 mg) was tested. It confirmed that VE extract has no acute toxicity in normal rats and alcohol-induced hepatitis rats. This study has demonstrated the safety of VE extract and its effect on free radicals reduction that results in attenuation of liver damages in the alcohol-induced hepatitis. VE extracts should be further study in clinic trial.

## Exclusive summary

ประเทศไทยมีความหลากหลายของพันธุ์พืชสมุนไพรและมีการนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคตามประสัยการณ์ที่สืบทอดกันมา หญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) เป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีการนำใช้เป็นส่วนประกอบในการรักษาโรคในตำราพื้นบ้านของไทย นอกจากนี้ในบัญชียาหลักแห่งชาติ บัญชียาจากสมุนไพรได้บรรจุผงหญ้าดอกขาวไว้ในยาลดความอ่อน感บุหรี่ ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ทางเคมีชีวภาพหลากหลาย ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ ต้านสารก่อการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง ดังนั้นสารสกัดหญ้าดอกขาวจึงน่าจะมีศักยภาพในการชะลอพยาธิสภาพการทำลายเซลล์จากการอักเสบของโรคเรื้อรังต่างๆได้ สารสำคัญของสารสกัดจากหญ้า พบว่ามีสารหลักกลุ่ม sesquiterpenoids มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์และการแพร่การกระจาย เซลล์มะเร็ง และสารในกลุ่ม terpenoids ที่มีฤทธิ์ต้านการอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ นอกจากนี้สารสกัดหญ้าดอกขาวมีความปลอดภัยและยังไม่มีรายงานด้านความเป็นพิษรุนแรงทั้งพิษเฉียบพลัน สารสกัดหญ้าดอกขาวจึงเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีแนวโน้มในการนำมาใช้รักษาภาวะอักเสบเรื้อรัง รวมทั้งภาวะอักเสบในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล เพื่อช่วยลดภาระการทำงานของโรคหรือใช้เป็นยาในการรักษาโรคตับจากแอลกอฮอล์

โรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease, ALD) เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรไทยและมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้น องค์การอนามัยโลก (world health organization, WHO) และศูนย์วิจัยปัญหาสุรماมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าประชากรไทยบริโภคแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น และการดื่มแอลกอฮอล์นับเป็นปัจจัยเสี่ยงสูงที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ โรคตับจากแอลกอฮอล์มีพยาธิสภาพที่หลากหลาย ตั้งแต่เกิดภาวะไขมันเกาะตับ (fatty liver), ตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis), ตับแข็ง (hepatic cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ทำให้เกิดอาการทางคลินิกมากมายและเปลี่ยนแปลง การทำงานของอ่อนเชิงหลักในตับ แอลกอฮอล์มีฤทธิ์ทำลายตับโดยเอทานอลจะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับและได้สารพิษ acetaldehyde และอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเซลล์ รวมทั้งกระตุ้นกระบวนการอักเสบอย่างต่อเนื่อง โรคตับจากแอลกอฮอล์เป็นหนึ่งในโรคที่ยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษาให้หายขาดทางคลินิก หลักการรักษาที่ดีที่สุดคือการชะลอหรือลดการทำลายเซลล์ตับโดยการลดการสร้างสารอนุมูลอิสระและสารก่อการอักเสบ การจดการดื่มแอลกอฮอล์ การให้โภชนาการที่เหมาะสม การให้ยาหรือสมุนไพรช่วยชะลอความรุนแรงของโรคตามอาการเท่านั้น การพัฒนายาหรือสมุนไพรเพื่อรักษาโรคตับหรือสารปักป้องตับ (hepatoprotective agents) จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรค

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ลดการทำลายตับของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำในภาวะตับอักเสบจากเอทานอล โดยศึกษาในหมู่ทดลองเพศผู้ที่ได้รับเอทานอลในขนาดสูงเป็นระยะเวลานานซึ่งมีพยาธิสภาพคล้ายกับโรคตับจากแอลกอฮอล์ เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายจะทำให้มีระดับเอนไซม์เกี่ยวข้องการทำงานของตับ (alanine transaminase; ALT และ aspartate transaminase; AST) ในเลือดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาพบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถลดระดับเอนไซม์เกี่ยวข้องการทำงานของตับทั้ง ALT และ AST ในหมู่ทดลองที่เกิดภาวะตับอักเสบจากเอทานอลได้ และสารสกัดหญ้าดอกขาวในทุกขนาดที่ทดสอบ สามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระในไมโครโซมจากตับของหมูที่เกิดภาวะตับอักเสบ เมื่อทดสอบด้านความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดหญ้าดอกขาวได้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาดสูงไม่ทำให้หมู่ทดลองปกติและหมูที่เกิดภาวะตับอักเสบเสียชีวิต และ

ไม่ส่งผลต่อการทำงานของตับ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวอาจจะมีผลต่อการทำงานของถุงน้ำดีได้เล็กน้อย

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งที่จะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยในระดับคลินิก และการนำสารสกัดหญ้าดอกขาวไปใช้ในผู้ป่วยต่อไป อย่างไรก็ตามการศึกษาสารสำคัญในสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำ และกลไกการออกฤทธิ์ต่อการต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์ รวมทั้งการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของหญ้าดอกขาวยังจำเป็นจะต้องมีการศึกษาในเชิงลึก ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นหลักฐานข้อมูลส่วนหนึ่งในการช่วยส่งเสริมการนำสมุนไพรท้องถิ่น หญ้าดอกขาว ซึ่งมีแนวโน้มในการพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคตับจากแอลกอฮอล์ รวมทั้งการนำไปใช้เป็นยาต้านการอักเสบในภาวะโรคเรื้อรังต่างๆ



## เนื้อหาการวิจัย

### บทนำ

พีชสมุนไพรในประเทศไทยมีความหลากหลายของพันธุ์พืช และมีการนำพีชสมุนไพรชนิดต่างๆมาใช้ในการบำบัดรักษาอาการและโรคตามองค์ความรู้และประสบการณ์ที่สืบทอดกันมาอย่างนาน การศึกษาทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการนำพีชสมุนไพรมาใช้ในทางการแพทย์ เพื่อส่งเสริมการนำพีชสมุนไพรในห้องถินไปสู่การพัฒนาจากวัตถุดิบภายในประเทศไทย ให้เกิดประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อประเทศไทย หญ้าดอกขาวเป็นพืชล้มลุกที่สามารถเจริญเติบโตและพบรได้ทั่วไปในห้องถิน และประเทศไทยในเดือนเชิง ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Vernonia cinerea* Less. หญ้าดอกขาวถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในตำราฯ ต่างๆในประเทศไทยและอินเดียมานาน ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย อาทิ ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ต้านมาเลเรียและหนองพยาธิ ต้านการอักเสบ ลดไข้ ลดปวด และขับปัสสาวะ นอกจากนี้ยังมีการนำหญ้าดอกขาวมาทดสอบในการรักษาโรคมะเร็ง รวมทั้งมีการนำหญ้าดอกขาวมาใช้ในการเลิกบุหรี่โดยพัฒนาเป็นชาชง ยาอม หรือ สเปรย์ เพื่อลดอาการถอนยาจากการติดนิโคตินในบุหรี่ ในบัญชียาหลักแห่งชาติ บัญชียาจากสมุนไพรได้บรรจุผงหญ้าดอกขาวไว้ในยาลดความอยากบุหรี่ จากผลการศึกษาเบื้องต้นที่พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ลดการอักเสบได้ดี โดยมีผลลดการสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น ในตริก ออกไซด์ และสารก่อการอักเสบ อาทิ ไซโตคายด์ tumor necrosis factor จึงน่าจะมีศักยภาพในการช่วยลดพยาธิสภาพการทำลายเซลล์จากการอักเสบของโรคเรื้อรังต่างๆได้ดี นอกจากนี้สารสกัดหญ้าดอกขาวมีความปลอดภัยและยังไม่มีรายงานด้านความเป็นพิษรุนแรงทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง

ภาวะตับอักเสบจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease) เป็นหนึ่งในโรคตับที่เป็นสาเหตุต้นๆของการสูญเสียทั้งชีวิตและทรัพย์สินของประชากรไทย และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการบริโภคแอลกอฮอล์ของประชากรไทยเพิ่มขึ้น รายงานสถานการณ์แอลกอฮอล์ขององค์กรอนามัยโลก (world health organization, WHO) ในปี ค.ศ. 2014 แสดงให้เห็นว่าประชากรไทยอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป มีค่าเฉลี่ยปริมาณการดื่มแอลกอฮอล์ต่อกันสูงขึ้น และยังแสดงผลกระทบทางด้านสุขภาพพบว่าประชากรไทยมีอัตราการเสียชีวิตจากโรคตับแข็งเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานสถานการณ์การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และผลกระทบในประเทศไทย ปี 2554 โดยศูนย์วิจัยปัญหาสุราพบว่า ร้อยละ 31.5 ของประชากรผู้ใหญ่บริโภคแอลกอฮอล์ หรือคิดเป็น 17 ล้านคน และในช่วงระยะเวลา 10 ปี (ปี พ.ศ. 2546- 2556) มีสัดส่วนของนักดื่มประจำเพิ่มขึ้น และมีปริมาณการแอลกอฮอล์ดื่มต่อปีเพิ่มขึ้น ผลกระทบต่อสุขภาพพบว่าแอลกอฮอล์จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงทางสุขภาพอันดับหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่า การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ก่อภาระโรคในรูปแบบของปัญหาต่อสุขภาพจิต บาดเจ็บจากอบติดเหตุ และโรคตับจากแอลกอฮอล์ ตามลำดับ ปัจจุบันยังไม่มียาสำหรับรักษาโรคตับจากแอลกอฮอล์ การรักษาหลักคือการช่วยลดความรุนแรงของโรคโดยการป้องกันไม่ให้เซลล์ตับที่เหลืออยู่ไม่ให้ถูกทำลายหรือเซลล์ตายเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การศึกษาเพื่อพยาบาลพัฒนาที่สามารถช่วยป้องกันหรือลดการทำลายเซลล์ตับจากโรคตับจากแอลกอฮอล์มีอย่างต่อเนื่อง ขณะนี้จึงมีการศึกษาพีชสมุนไพรห้องถินที่มีคุณสมบัติด้านการอักเสบและอนุมูลอิสระมาทดสอบในโรคตับ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาสมุนไพรสำหรับรักษาโรคตับจากแอลกอฮอล์

การศึกษาฤทธิ์ลดการทำลายตับและความปลอดภัยทางพิชวิทยาของสารสกัดหญ้าดอกขาวนี้ เป็นงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มุ่งศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าดอกขาวในหุบ

ทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบจากแอลกอฮอล์ เพื่อให้เกิดความเข้าใจและนำไปสู่การพัฒนาสารกัดหญ้าดอกข้าวสำหรับใช้เป็นยาสมุนไพรในโรคตับอักเสบจากแอลกอฮอล์ ในทางคลินิกต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- เพื่อทดสอบฤทธิ์ลดการทำลายตับของสารสกัดหญ้าดอกข้าว (*Vernonia cinerea*) ในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบจากแอลกอฮอล์
- เพื่อประเมินผลของสารสกัดหญ้าดอกข้าวต่อระดับอนุมูลอิสระ ในชีร์รั่มและในตับของหนูทดลอง
- เพื่อทดสอบความเป็นพิษ (acute toxicity) ของสารสกัดหญ้าดอกข้าวในหนูทดลองและหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบจากแอลกอฮอล์

### ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ลดการทำลายตับของสารสกัดหญ้าดอกข้าวต่อภาวะตับอักเสบจากเอทานอล งานวิจัยนี้เป็นการทดลองในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูขาวใหญ่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบโดยการให้แอลกอฮอล์ติดต่อกันจนหนูเกิดภาวะตับอักเสบ และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำลายตับของสารสกัดหญ้าดอกข้าวเปรียบเทียบกับการใช้สารมาตรารู莽 คือ silymarin ซึ่งเป็นสารสกัดสมุนไพรที่นิยมใช้ในทางคลินิก

### การทบทวนวรรณกรรม

หญ้าดอกข้าว (หรือชื่ออื่นๆ หญ้าหมอน้อย, หญ้าละอง, หญ้าสามวัน) เป็นพืชสมุนไพรในแบบเอเชีย มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vernonia cinerea* Less. 属于菊科 Asteraceae การนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรประกอบในตำรายาต่างๆ ในแบบเอเชีย อินเดีย จีน รวมทั้งในประเทศไทย จากหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหญ้าดอกข้าวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย อาทิ ลดตันมีฤทธิ์แก้ปวดห้อง รักษาแพ้อุดร รักษาภากลากเกลื่อน รักษาดีซ่าน (Kirkitar, 1975) รายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารสกัดจากหญ้าดอกข้าวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ สารสกัดเมทานอลจากใบหญ้าดอกข้าวพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดไข้ และลดปวดได้ดีในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carageenin, histamine หรือ serotonin และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับยาต้านการอักเสบและสเปรเวริน (Iwalewa et al., 2003; Malaya Gupta, 2003) ในหนูที่ถูกกระตุ้นเป็นข้ออักเสบรูมาตอยด์ อาทรยติส (rheumatoid arthritis) เมื่อได้รับสารสกัดจากหญ้าดอกข้าวสามารถลดอาการอักเสบ โดยลดอาการข้อบวมและลดระดับเอนไซม์ในพลาสมาที่สูงขึ้นจากการอักเสบได้ดี (Latha et al., 1998) ในหลายการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกข้าวยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก อาทิ *S. aureus*, *B. subtilis* และแกรมลบ เช่น *E. coli*, *P. aeruginosa* (Gupta et al., 2003; Yoga Latha et al., 2009) รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง(Pratheeshkumar and Kuttan, 2012) ในปัจจุบันได้มีการนำหญ้าดอกข้าวมาทำเป็นชาชงใช้สำหรับเลิกบุหรี่ โดยพบว่าหญ้าดอกข้าวสามารถช่วยลดอาการถอนยา (withdrawal symptoms) ในผู้ติดบุหรี่ได้และทำให้ผู้ป่วยเลิกบุหรี่เร็วขึ้น (Wongwiwatthanananukit et al., 2009) โดยหญ้าดอกข้าวมีผลลด oxidative stress และเพิ่มการหลั่งสารในกลุ่ม beta-endorphin (Leelarungrayub et al., 2010)

สารสำคัญของสารสกัดจากหญ้าดอกขาวในเมทานอลหรือคลอโรฟอร์ม จากการวิเคราะห์พบว่ามีสารหลายกลุ่ม ได้แก่ steroids, glycosides, flavanoids, sesquiterpenoids และ terpenoids (Toyang and Verpoorte, 2013) สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลักเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenoids ได้แก่ vernolide-A ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์และการแพร่กระจาย (antimetastasis) ต่อเซลล์มะเร็ง (Kuo et al., 2003; Pratheeshkumar and Kuttan, 2011a) และสารในกลุ่ม terpenoids ที่มีฤทธิ์ต้านการอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Iwalewa et al., 2003) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในหญ้าดอกขาวยังไม่ชัดเจนและยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป ด้านความเป็นพิษ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวมีความปลอดภัย เมื่อให้สารสกัดในขนาดในขนาดสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ไม่พบว่ามีเหตุการณ์และไม่มีความเป็นพิษต่ออวัยวะสำคัญ (Latha et al., 2010) สารสกัดหญ้าดอกขาวจึงเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีแนวโน้มในการนำมาใช้รักษาภาวะอักเสบเรื้อรัง รวมทั้งภาวะการอักเสบในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล เพื่อช่วยลดภาระการดำเนินของโรคหรือใช้ในการรักษาโรคตับจากแอลกอฮอล์ได้

โรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease, ALD) เป็นหนึ่งในโรคที่มีพนบอยในประเทศไทยและมีแนวโน้มจะมีอุบัติการณ์เกิดขึ้น สาเหตุหลักมาจากการได้รับแอลกอฮอล์ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานและได้รับในปริมาณสูง ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคตับอักเสบเรื้อรัง ซึ่งมีการพัฒนาพยาธิสภาพของโรคให้เกิดเป็นภาวะตับแข็ง (cirrhosis) มะเร็ง (hepatocellular carcinoma) และการเสียชีวิตของผู้ป่วยในที่สุด (O'Shea et al., 2010) การบริโภคแอลกอฮอล์ของประชากรไทยเพิ่มขึ้น รายงานสถานการณ์แอลกอฮอล์ขององค์กรอนามัยโลก (world health organization, WHO) ในปี ค.ศ. 2014 แสดงให้เห็นว่าประชากรไทยอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป มีค่าเฉลี่ยปริมาณการดื่มแอลกอฮอล์ต่อกันสูงขึ้น (7.1 ลิตร/คน) เป็นตัวเลขที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยทั่วโลก (6.2 ลิตร/คน) และสูงเกินสองเท่าของค่าเฉลี่ยปริมาณการดื่มแอลกอฮอล์ต่อกันในเอเชีย (3.4 ลิตร/คน) นอกจากนี้รายงานได้แสดงผลผลกระทบทางด้านสุขภาพ พบว่าประชากรไทยมีอัตราการเสียชีวิตจากโรคตับแข็งเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานสถานการณ์การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และผลกระทบในประเทศไทย ปี 2554 โดยศูนย์วิจัยปัญหาสุราพบว่าประชากรผู้ใหญ่ประมาณ 17 ล้านคน หรือคิดเป็นร้อยละ 31.5 บริโภคแอลกอฮอล์ และในช่วงระยะเวลา 10 ปี (ปี พ.ศ. 2546-2556) มีสัดส่วนของนักดื่มประจำเพิ่มขึ้น และมีปริมาณการบริโภคแอลกอฮอล์ต่อปีเพิ่มขึ้น ผลกระทบต่อสุขภาพพบว่าแอลกอฮอล์จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงทางสุขภาพอันดับหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่า การดื่มแอลกอฮอล์ก่อให้เกิดภาวะโรคในรูปแบบของปัญหาต่อสุขภาพจิต บาดเจ็บจากอุบัติเหตุ และโรคตับจากแอลกอฮอล์ ตามลำดับ

อาการทางคลินิกของโรคตับจากแอลกอฮอล์ (ALD) ขึ้นอยู่กับสภาพตับของผู้ป่วย ในระยะแรกผู้ป่วยมักมีอาการไม่เด่นชัด เช่น อ่อนเพลียง่าย เบื้องต้น เมื่อการดำเนินของโรคมากขึ้นและไม่มีการป้องกันการทำลายเซลล์ตับ จะมีอาการทางคลินิกชัดเจนเนื่องจากการทำงานของตับเสียไป ได้แก่ ตัวเหลือง ตาเหลืองจากดีช่าน (jaundice), ห้องман (ascites) ขับลมเท้าบวม มีจ้ำเลือดเขียวตามตัว การแข็งตัวเลือดผิดปกติ ผิวนั้นมีสีคล้ำ ติดเชื้อย่างยี่เนื่องจากภูมิคุ้มกันลดลง มีอาการในระบบสมองส่วนกลาง (hepatic encephalopathy) มีการคั่งของของเสีย (urea) และสารพิษต่างๆในร่างกายสูงมากขึ้น นอกจากนี้ผู้ป่วย ALD ในระยะตับแข็งจะเกิดภาวะแทรกซ้อนอื่นๆที่รุนแรง ได้ เช่น ผลต่อระบบไต (hepatorenal syndrome) และมะเร็งตับ (Gramenzi et al., 2006; Heidelbaugh J, 2006) ทั้มนาการของโรคประกอบด้วย 4 โรคหลัก คือ ไขมันเกาะตับ (fatty liver), ตับอักเสบ (hepatitis), ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) (Arteel et al., 2003; Sougioultzis et al., 2005) ผลกระทบของเอทานอลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพโรคในร่างกายมีความซับซ้อนและมีกลไกการ

ออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องหลากหลาย พิษโดยตรงของเอทานอลต่อตับเกิดจากเอทานอลจะถูกเปลี่ยนแปลงที่เซลล์ตับด้วยปฏิกิริยา oxidation-reduction ด้วยเอนไซม์หลัก alcohol dehydrogenase ได้สาร acetaldehyde ที่เป็นพิษ เอทานอลยังถูกเปลี่ยนแปลงด้วยระบบไมโครโซมอล (microsomal ethanol oxidizing system) ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) ได้สารกลุ่มอนามูลอิสระ (Lieber, 2005a) ทั้ง acetaldehyde และอนามูลอิสระต่างๆ มีผลต่อการนิวคลิอิค โปรตีน และไขมันต่างๆในเซลล์ตับ ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับและเซลล์อื่นๆตามมา (Arteel et al., 2003; Helmut et al., 2005; Lieber, 2004) ในโตคอนเดรียเป็นส่วนแรกที่ถูกทำลายและก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ มีผลทำให้สารก่อการอักเสบชนิดต่างๆถูกกระตุ้นและสร้างเพิ่มมากขึ้น

การรักษาทางคลินิกของผู้ป่วย ALD ที่ดีที่สุดคือการชะลอเซลล์ตับอักเสบและลดการสร้างสารก่อการอักเสบและอนามูลอิสระ การรักษาตามอาการ ร่วมกับให้การดูแลทางด้านโภชนาการเป็นหลัก (Leoni S, 2006) ในทางคลินิกนั้นจะเริ่มต้นจากการให้ผู้ป่วย ลด ละ เลิกการดื่มแอลกอฮอล์ ร่วมกับการให้โภชนาการที่เหมาะสม เนื่องจากยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษาโรคนี้ ในผู้ป่วยที่มีภาวะตับอักเสบแล้วอาจได้รับยาที่ลดการอักเสบชนิดต่างๆ ได้แก่ กลุ่มสเตียรอยด์ (corticosteroid), pentoxifylline ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$ , สารในกลุ่มต้านอนามูลอิสระ เช่น S-adenoxylmethionine (SAMe), N-acetyl cysteine กลุ่มแอนติบอดีต้านสารก่อการอักเสบ (monoclonal antibody) และกลุ่มสารสกัดจากพืชสมุนไพร silymarin (Zhang et al., 2013) อย่างไรก็ตามยากลุ่มต่างๆจะให้ผลการปกป้องตับไม่ชัดเจน และมีอาการไม่พึงประสงค์ที่ค่อนข้างรุนแรง (Day, 2007) การนำสมุนไพรและสารสกัดสมุนไพรที่คาดว่ามีฤทธิ์ชัลโภภาวะอักเสบเรื้อรังได้ดีอาจสามารถป้องกันและช่วยการทำลายเซลล์ตับ พืชสมุนไพรหลายชนิด ในประเทศไทยและต่างประเทศที่มีการนำมาศึกษาแนวโน้มในการเป็นสารปกป้องเซลล์ตับและช่วยการอักเสบ อาทิ Thumergia laurifolia Linn. (ราชจีด) (Pramyothin et al., 2005), Phyllanthus emblica Linn. (มะขามป้อม) (Pramyothin et al., 2006), Artemisia capillaries (Koo et al., 2002)

## อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

### สารสกัดหญ้าดอกข้าว

ผงแห้งหญ้าดอกข้าว (โรงพยาบาลบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก) มาจากส่วนลำต้นและดอกของหญ้าดอกข้าวถูกนำมาทำให้สะอาด อบให้แห้งและย่อยมีขนาดเล็ก ผงแห้งหญ้าดอกข้าวนำมาสกัดด้วยน้ำ (water extract) โดยใช้เครื่องสกัดสารแบบซอกเล็ท (Soxhlet extraction) โดยหมักไว้ระยะเวลา 16 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำสองครั้ง เก็บรวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดนำมากรองและทำให้แห้งในภาวะเยือกแข็งแห้ง (freeze dry) สารสกัดแห้ง (crude extract) ที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้การทดสอบต่อไป

### การเตรียมสัตว์ทดลองและการกระตุ้นหมูทดลองด้วยเอทานอล

หมูขาวใหญ่เพศผู้ (rat) สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 180-200 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถูกนำมาพักในห้องเลี้ยง สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร มีการควบคุมอุณหภูมิ ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) และความชื้น และได้รับอาหารและน้ำตามปกติ (*ad libitum*) ก่อนเริ่มการทดลองหนึ่งสัปดาห์ หมูขาวก่อนเริ่มการทดลองจะมีน้ำหนักประมาณ 230-250 กรัม หมูถูกแบ่งกลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

#### 1. กลุ่มควบคุม

2. กลุ่มได้รับ 40% ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 61 ได้รับ silymarin 100 mg/kg (40 วัน)
3. กลุ่มได้รับ 40% ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 61 ได้รับ vehicle (normal saline) (45 วัน)
4. กลุ่มได้รับ 40% ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 61 ได้รับ สารสกัดหญ้าดอกข้าว ละลายน้ำ phosphate buffer saline (PBS) ในขนาด 125 mg/kg (45 วัน)
5. กลุ่มได้รับ 40% ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 61 ได้รับ สารสกัดหญ้าดอกข้าว ละลายน้ำ phosphate buffer saline ในขนาด 250 mg/kg (45 วัน)
6. กลุ่มได้รับ 40% ethanol (60 วัน); และ ณ วันที่ 61 ได้รับ สารสกัดหญ้าดอกข้าว ละลายน้ำ phosphate buffer saline ในขนาด 500 mg/kg (45 วัน)
7. กลุ่มได้รับ 60% glucose (isocaloric to ethanol) (60 วัน); และ ณ วันที่ 61 ได้รับ vehicle (45 วัน)

#### การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (OECD guideline)

หนูขาวจะต้องรับสารสกัดหญ้าดอกข้าวครั้งเดียวในขนาดสูง 5,000 mg/kg จากนั้นสังเกตอาการในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ถ้าสัตว์ทดลองยังมีชีวิตให้สังเกตอาการต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงเก็บเลือดและทำให้ตายอย่างสงบ แล้วนำทดสอบผลต่อการทำงานของตับต่อไป พิษเฉียบพลันนี้จะทดสอบทั้งในหนูปกติและหนูที่ได้รับ 40% ethanol ในระยะเวลา 60 วัน โดยทำการทดลองในหนู กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

8. กลุ่มได้รับสารสกัดหญ้าดอกข้าวครั้งเดียว 5000 mg/kg
9. กลุ่มได้รับ 40% ethanol (60 วัน) และได้รับสารสกัดหญ้าดอกข้าวครั้งเดียว 5000 mg/kg

#### การทดสอบทางชีวเคมี

เลือดหนูทุกตัวจะถูกเก็บจากปลายหางและถูกนำมาปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ซีรัมที่ได้จะนำมาตรวจการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการทำงานของตับ เช่น alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) และ lactate dehydrogenase ด้วยชุดน้ำยาตรวจการทำงานเอนไซม์ (Human<sup>TM</sup>, Wiesbaden, Germany) ผลการทดลองโดยอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) โดยสเปกโตรโฟโตเมตร์ และนำค่ามาคำนวณกลับให้อยู่ในหน่วยของ traditional unit (U/L)

#### การสกัดไมโครโซมอล (microsomal extract) จากเนื้อเยื่อตับ

ตับหนูขาว 1 g ในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 ถูกนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และปั่นละเอียดด้วย homogenizer จากนั้นนำมาปั่นแยกด้วย centrifuge ที่ 4°C (10,000 g x 30 min) ส่วน supernatant ถูกเก็บแล้วนำมาปั่นแยกอีกครั้งด้วย ultracentrifuge ที่ 4°C (100,000 g x 1 hour) แล้วแยกส่วนตกตะกอน (pellet) ซึ่งเป็นส่วน microsomal extract จากเนื้อเยื่อตับ จากนั้นมาเก็บในสารละลาย PBS ที่มี 20% glycerol และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C สำหรับนำไปใช้วัด oxidative stress ต่อไป

#### การประเมินภาวะ oxidative stress ในตับ

วัดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยวิธี thiobarbituric acid reactive (TBARs) assay โดยจะวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตผลสุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่อยู่ในตับ โดยนำส่วน microsomal extract จากเนื้อเยื่อตับไปวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay kit (Pierce®)

จากนั้นนำ microsomes 2.5 mg/ml ปริมาตร 500  $\mu$ l มาวัด TBARs โดยการเติม TBARs reagent (1.4 % trichloroacetic acid, 10% thiobarbituric acid, 8% HCl ratio: 1:2:1) และนำไปวัด fluorescence ที่ความยาวคลื่น 485 nm (excitation) และ 535 nm (emission) ค่าที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณ MDA จากส่วนราชการมาตราฐาน MDA ในหน่วยไมโครโมลาร์

### วิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจากการทดลองโดยการนำผลการทดลองทุกตัวอย่างทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่ได้รับผลจากการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SD) การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยใช้ student t-test ( $P < 0.05$ ) ในกรณีที่มีการเปรียบเทียบกลุ่มทดสอบหลายกลุ่มกับกลุ่มควบคุม การวิเคราะห์ทาง สถิติจะใช้ ANOVA ( $P < 0.05$ )

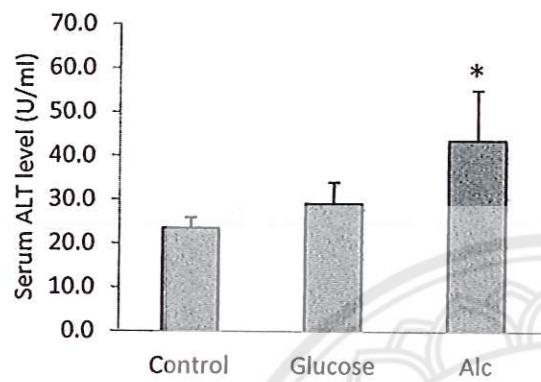
### ผลการศึกษาวิจัย

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพตับในหนูขาวที่มีภาวะตับอักเสบจากเอทานอล

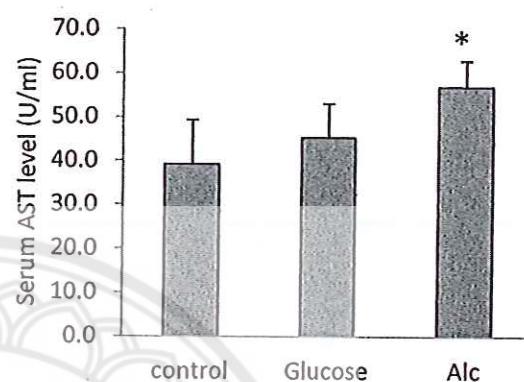
หนูขาวถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบ โดยได้รับเอทานอลในขนาดสูงสุด 6 g/kg ต่อวัน โดยป้อนผ่านหลอดให้อาหาร (oral intubation) ติดต่อกัน 60 วัน และจะมีการเก็บเลือดหนูทุก 2 สัปดาห์ เพื่อนำมาทดสอบระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพตับ (liver function enzymes) ในชีร์ม 2 ชนิด หลัก คือ alanine transaminase (ALT) หรือ serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) และ aspartate transaminase (AST) หรือ serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) นอกจากนี้ เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งพบได้ในเซลล์ท่อน้ำดีในตับ และ lactate dehydrogenase (LDH) ยังเป็นเอนไซม์อีกสองชนิดที่จะพบว่ามีระดับสูงขึ้นเมื่อเซลล์ตับถูกทำลาย จากผลการทดสอบ enzyme activity ในพลาสมา พบร่วมเอนไซม์ AST และ ALT มีระดับเพิ่มสูงขึ้นต่อเนื่อง เมื่อให้อาหารอลกิตติดต่อ กันนาน 60 วัน จะพบว่ามีระดับของเอนไซม์ AST และ ALT มีระดับเพิ่มสูงขึ้นต่อเนื่อง เมื่อให้อาหารอลกิตติดต่อ กันนาน 60 วัน จึงพบว่ามีระดับของเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดัง แสดงในรูป 1 (1A-1B) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าหนูที่ได้รับเอทานอลเกิดภาวะตับอักเสบอย่างชัดเจน สำหรับ ผลต่อ ALP และ LDH พบร่วมตับเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน อย่างไรก็ตามระดับเอนไซม์ ALP และ LDH ที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูป 1 (1C-1D) จากนั้นนำหนู ขาวอยู่ในภาวะตับอักเสบมาแบ่งกลุ่มโดยแต่ละกลุ่มยังคงได้รับเอทานอลต่อเนื่องทุกวันและได้รับตัวทำละลาย (PBS) หรือ สารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาด 125, 250, 500 mg/kg หรือ silymarin ขนาด 100 mg/kg ต่อวัน ติดต่อกันอีก 45 วันผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวมีลดระดับ ALT, AST และ LDH ในหนู ขาวที่เกิดภาวะตับอักเสบและยังคงได้รับเอทานอลทุกวัน โดยสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้น 500 mg/kg สามารถลดระดับเอนไซม์ ALT, AST และ LDH ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามสารสกัดไม่มี ผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ ALP นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่า silymarin สามารถลดระดับเอนไซม์ AST เพียงเล็กน้อยรวมทั้งไม่สามารถลดระดับ ALT, LDH และ ALP ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ได้รับเอทานอลและ ตัวทำละลาย (PBS) ดังแสดงในรูปที่ 2 (2A-2D) สำหรับกลุ่มหนูที่ได้รับกลูโคสให้พลงงานเทียบเท่ากับเอทานอล

นอล (isocaloric equivalence) พบรากการได้รับสารให้พลังงานมีแนวโน้มเพิ่มระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพตับเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

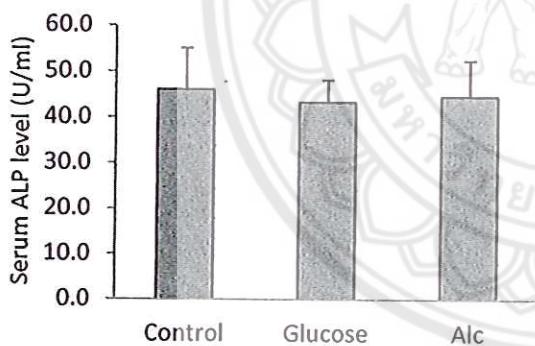
**1A Effect of ethanol on serum ALT in ethanol-stimulated rats**



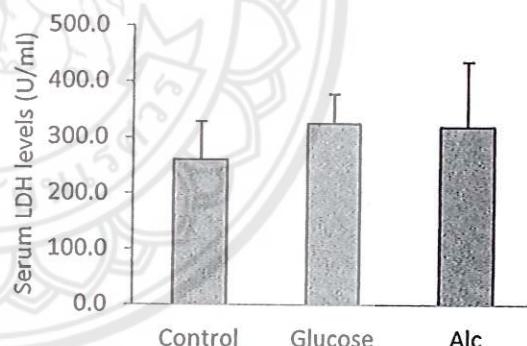
**1B Effect of ethanol on serum AST in chronic-stimulated rats**



**1C Effect of ethanol on serum ALP in chronic-stimulated rats**



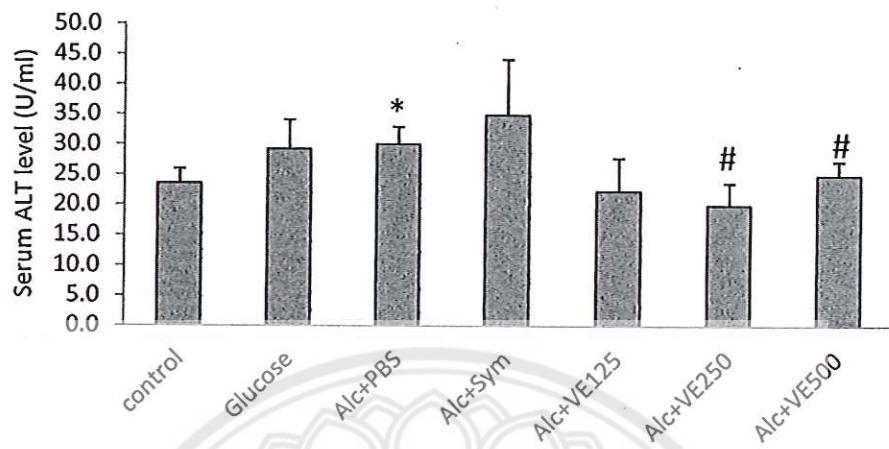
**1D Effect of alcohol on serum LDH in chronic-stimulated rats**



รูปที่ 1. ผลของเอทานอลต่อระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพตับในหนูที่ถูกกระตุนต่อเนื่อง 60 วัน หนูขาวได้รับเอทานอล 6 g/kg ต่อวันติดต่อ กัน 60 วัน ผลของเอทานอลต่อระดับเอนไซม์ ALT (1A), AST (1B), ALP (1C) และ LDH (1D) ในชีร์มถูกนำมาระดับด้วยชุดตรวจการทำงานของเอนไซม์ ผลการศึกษาแสดงระดับการทำงานของเอนไซม์ในชีร์มในหน่วย U/ml เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean  $\pm$  SD) จากการวัดในหนูกลุ่มละ 3-6 ตัว \* แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วย t-test ( $p < 0.5$ ).  
Alc: ethanol, ALT: alanine transaminase, AST: aspartate transaminase, ALP: alkaline phosphatase, LDH: lactate dehydrogenase

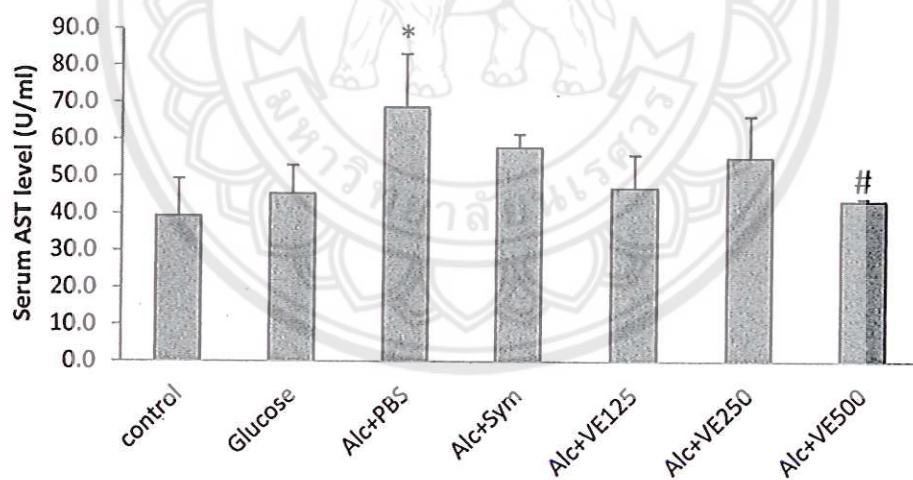
**2A**

*Effect of Vernonia cinerea extracts on serum ALT level in chronic ethanol-induced hepatitis rats.*



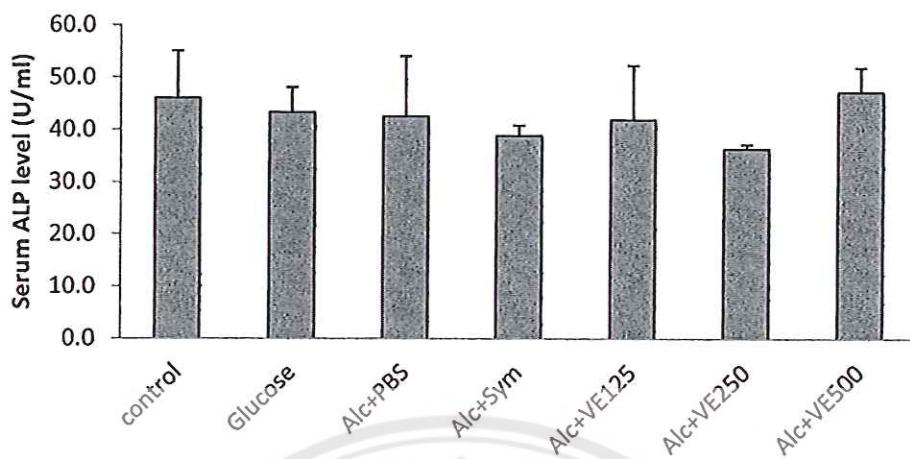
**2B**

*Effect of Vernonia cinerea extracts on serum AST level in chronic ethanol-induced hepatitis rats.*



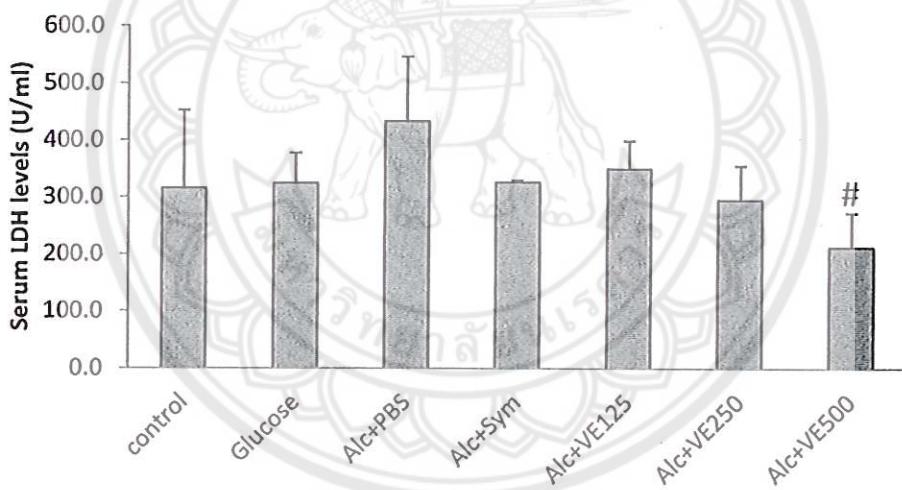
2C

### Effect of *Vernonia cinerea* extract on ALP level in chronic ethanol-induced rats.



2D

### Effect of *Vernonia cinerea* extract on LDH levels in chronic ethanol-stimulated rats



รูปที่ 2. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพตับในหนูขาวที่มีตับอักเสบจากเอทานอล

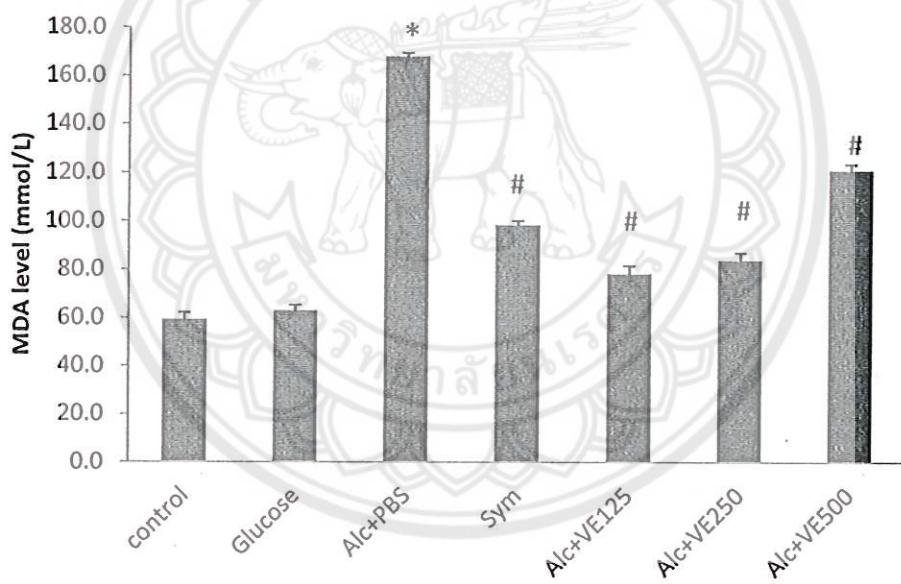
หนูขาวที่มีภาวะตับอักเสบ (ได้อาทานอล 60 วัน) ยังคงได้รับเอทานอล 6 g/kg ร่วมกับ silymarin 100 mg/kg หรือสารสกัดหญ้าดอกขาว (VE) ในขนาด 125, 250, 500 mg/kg ต่อวัน อีกเป็นเวลาอีก 45 วัน เอนไซม์ ALT (1B), AST (2B), ALP (2C) และ LDH (2D) ในชีรื้มถูกวัดด้วยชุดตรวจการทำงานเอนไซม์ ผลการศึกษาแสดงระดับการทำงานเอนไซม์ในหน่วย U/ml (mean  $\pm$  SD) ในหนูกลุ่มละ 3-6 ตัว \*,แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม และ #, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเอทานอลร่วมกับตัวทำละลาย (PBS) ( $p < 0.5$ ), ทดสอบด้วย t-test

Alc: ethanol, Sym: silymarin, VE : *Vernonia cinerea* water extracts, PBS: phosphate buffer saline

ALT: alanine transaminase, AST: aspartate transaminase, ALP: alkaline phosphatase, LDH: lactate dehydrogenase

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อภาวะ oxidative stress ในตับหมูที่มีภาวะตับอักเสบจากเอทานอล จึงเนื้อตับของหมูขาวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบต่างๆ ถูกนำมาสกัดแยกส่วนสำหรับส่วนในโคโรซ์ม (microsomes) และนำมาทดสอบภาวะ oxidative stress ด้วยการวัดหาปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตผลสุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation ผลการทดสอบพบว่า หมูขาวที่ได้รับเอทานอลขนาดสูงเป็นระยะเวลาต่อเนื่องมีภาวะตับอักเสบจะมีระดับ MDA เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหมูกลุ่มควบคุม หมูขาวที่มีภาวะตับอักเสบเมื่อได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาดต่างๆ 125, 250, 500 mg/kg หรือ silymarin 100 mg/kg ต่อวันต่อเนื่องอีก 45 วัน ผลการวัดภาวะ oxidative stress ในไมโครโซมแสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวสามารถลดการสร้าง MDA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มหมูที่มีภาวะตับอักเสบและได้รับเฉพาะตัวทำละลาย (PBS) นอกจากนี้ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่า silymarin สามารถลดการสร้าง MDA ได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน และสำหรับหมูในกลุ่มได้รับกลูโคส (isocaloric equivalence) พบร่วมปริมาณการสร้าง MDA ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 3

### Effect of *Vernonia cinerea* extract on lipid peroxidation in rat liver microsomes



รูปที่ 3. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อ lipid peroxidation ในไมโครโซมจากตับหมูขาว หมูขาวที่ได้รับเอทานอลนาน 60 วันจนเกิดภาวะตับอักเสบจะได้รับเอทานอลต่อเนื่อง 6 g/kg ร่วมกับ silymarin 100 mg/kg หรือสารสกัดหญ้าดอกขาว (VE) ในขนาด 125, 250, 500 mg/kg ต่อวัน อีกเป็นเวลาอีก 45 วัน ตับหมูทุกกลุ่มนำมาแยกส่วนให้ได้ไมโครโซม และนำไมโครโซมมาวัดหาปริมาณ MDA ด้วย TBAR assay ผลการศึกษาแสดงปริมาณ MDA ในหน่วย mmol/L (mean  $\pm$  SD) จากตับหมูกลุ่มละ 3-6 ตัว \*, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม และ #, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเอทานอลร่วมกับตัวทำละลาย (PBS) ( $p < 0.5$ ), ทดสอบด้วย t-test

Alc: ethanol, Sym: silymarin, VE : *Vernonia cinerea* water extracts, PBS: phosphate buffer saline

MDA: malonidehyde

## พิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อภาระการทำงานของตับหนูขาว

การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อภาระการทำงานของตับในหนูขาว ปกติหรือกลุ่มควบคุม และหนูขาวที่มีภาวะตับอักเสบจากเอทานอล เมื่อได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาดสูง ครั้งเดียว (5000 mg single dose) และติดตามผลความเป็นพิษภายใน 24 ชั่วโมง พบร่วมกับทุกตัวทุกกลุ่มโดยรวมอยู่ในสภาพปกติ ไม่มีหนูเสียชีวิต เมื่อติดตามอาการของหนูในระยะเวลา 2 สัปดาห์พบว่าหนูทุกตัวยังคงมีสภาพปกติ จากนั้นเมื่อวัดระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพตับ ALT, AST, ALP และ LDH ในชีรั่ม พบร่วมกับทุกตัวที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาดสูงครั้งเดียว มีปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานตับหลัก ALT และ AST รวมทั้งเอนไซม์ LDH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว อย่างไรก็ตามในการทดสอบนี้พบว่าระดับเอนไซม์ ALP มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว หนูขาวกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบจากเอทานอลนั้นมีระดับเอนไซม์ ALT และ AST เพิ่มสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเอนไซม์ ALP และ LDH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ดังที่แสดงก่อนหน้านี้ (รูปที่ 1) เมื่อหนูขาวภาวะตับอักเสบได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาดสูง 5000 มิลลิกรัมครั้งเดียว พบร่วมกับระดับเอนไซม์ ALT, AST และ LDH มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเทียบ กับหนูภาวะตับอักเสบที่ไม่ได้รับสารสกัด หรืออาจมีผลทำให้ AST ลดลงได้เล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการได้รับสารสกัดขนาดสูงในหนูภาวะตับอักเสบมีผลทำให้ระดับ ALP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำมาในโครงข่ายจากตับมาทดสอบการเกิด lipid peroxidation พบร่วมกับทุกตัวที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวไม่มีผลต่อระดับ MDA แต่ในภาวะตับอักเสบพบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวลดระดับ MDA ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรือลดการเกิด lipid peroxidation ได้ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาดสูงต่อภาระการทำงานของตับหนูขาวปกติและหนูขาวที่ภาวะตับอักเสบจากเอทานอล

	Control	Control + VE (5000 mg) (mean $\pm$ SD)	Alc	Alc + VE (5000 mg)
ALT (U/ml)	23.57 $\pm$ 2.4	34.28 $\pm$ 15.2	43.65 $\pm$ 11.4*	34.97 $\pm$ 12.7
AST (U/ml)	39.25 $\pm$ 10.1	40.56 $\pm$ 15.1	68.73 $\pm$ 14.5*	61.38 $\pm$ 16.1*
ALP (U/ml)	40.55 $\pm$ 9.6	74.96 $\pm$ 11.7*	42.50 $\pm$ 11.6	79.72 $\pm$ 8.2**
LDH (U/ml)	315.61 $\pm$ 137.2	313.77 $\pm$ 131.6	433.73 $\pm$ 113.1	459.37 $\pm$ 42.4
MDA (mmol/L)	71.14 $\pm$ 2.7	87.20 $\pm$ 2.1	168.0 $\pm$ 1.7*	55.00 $\pm$ 2.0**

Alc: ethanol, VE : *Vernonia cinerea* water extracts, MDA: malonidehyde

ALT: alanine transaminase, AST: aspartate transaminase, ALP: alkaline phosphatase, LDH: lactate dehydrogenase

## อภิปรายผลการศึกษา

โรคตับจากแอลกอฮอล์ (ALD) เกิดจากการได้รับเอทานอลในขนาดสูงเป็นระยะเวลา ต่อเนื่อง เป็นผลจากพิษของเอทานอลโดยตรงต่อเซลล์ตับและจากสาร acetaldehyde และอนุมูลอิสระ ต่างๆ ที่มาจากการเปลี่ยนแปลงเอทานอลภายในเซลล์ตับ สารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งมีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันให้หลังสารก่อการอักเสบ cytokines ต่างๆออกมานา (Seth et al., 2011) ในผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อตับถูกทำลายและเกิดการอักเสบเรื้อรัง ทำให้เกิดพยาธิสภาพของ โรคตับตั้งแต่ภาวะไขมันเกาะตับ (fatty liver), ตับอักเสบ (hepatitis), ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) (Arteel et al., 2003; Lieber, 2004; Lieber, 2005b; Lucey et al., 2009) ในทางคลินิกการวัดระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องประสิทธิภาพตับคือ ALT และ AST สามารถระบุ ภาวะตับอักเสบ เมื่อจากเซลล์ตับที่ถูกทำลายมีการปลดปล่อยเอนไซม์ ALT และ AST ออกมานาในพลาสมา ทำให้มีระดับของ ALT และ AST สูงขึ้นตั้งแต่ 2-3 เท่าของระดับปกติสูงสุด (normal upper limit) อย่างไรก็ตามระดับเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นไม่สามารถบ่งชี้ความรุนแรงของโรคได้ชัดเจน (Torruellas et al., 2014) การตรวจวัดเอนไซม์อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับและน้ำดี อาทิ ALP รวมทั้งเอนไซม์ LDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยบ่งชี้ภาวะเซลล์ถูกทำลาย ช่วยในการระบุภาวะอักเสบจากแอลกอฮอล์ได้ในระดับหนึ่ง ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบในหมู่ทดลองที่ได้รับเอทานอลในขนาดสูงทุกวัน เป็นระยะเวลา 60 วัน จึง จำลองให้ใกล้เคียงกับพัฒนาการของโรค ALD ในผู้ป่วยจริง หมูขาวที่ได้รับเอทานอลจะมีระดับของเอนไซม์ ALT และ AST ค่อนข้างเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยทำการเจาะระดับเอนไซม์ทุกๆ สองสัปดาห์ เมื่อตรวจวัด ระดับเอนไซม์มีระดับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับหมูขาวกลุ่มที่ไม่ได้รับเอทานอล (หมูกลุ่ม ควบคุม) เป็นการระบุได้ว่าตับของหมูที่ได้รับเอทานอลถูกทำลายบางส่วนและเกิดภาวะตับอักเสบ สำหรับ การวัดระดับเอนไซม์ ALP และ LDH พนักงานเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับเอทานอล ต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อถูกน้ำดีและเซลล์อื่นๆบางส่วนมีการถูกทำลาย อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในด้านพลังงานจากสารอาหาร เอทานอลเป็นสารที่ถูกเปลี่ยนแปลงและสามารถให้พลังงานได้ โดยเฉพาะ นอล 1 กรัมจะให้พลังงาน 7 แคลอรี่ ในการศึกษาครั้งนี้จึงการทดสอบโดยหมูกลุ่มที่ได้รับกลูโคสซึ่งเป็น สารอาหารที่ให้พลังงานต่อร่างกาย (กลูโคส 1 กรัมให้พลังงาน 4 แคลอรี่) ในปริมาณที่เทียบเท่ากับ พลังงานจากการได้รับเอนไซม์ (isocaloric equivalence) ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า หมูที่ ได้รับกลูโคสต่อเนื่องนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ ALT และ AST นอกจากนี้กลูโคสไม่มีผล ต่อการเปลี่ยนแปลงภาวะ oxidative stress ในตับดังแสดงในผลการทดสอบในไนโตรโซมจากตับหมู เพราะฉะนั้นการได้รับพลังงานจากสารอาหารไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ ซึ่งยืนยันได้ว่าความเป็นพิษ ของเอทานอลต่อตับนั้นมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารเคมี acetaldehyde และอนุมูลอิสระต่างๆที่ถูกสร้างขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงเ อทานอล สารเหล่านี้มีผลทำลายเซลล์ตับและเซลล์อื่นๆ และก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบเรื้อรัง (Lieber, 2005a; Mandrekar and Szabo, 2009)

การทดสอบสารสกัดหญ้าดอกข้าวในน้ำในหมูที่เกิดภาวะตับอักเสบร่วมกับการได้อเทา นอลอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นการจำลองลักษณะของผู้ป่วยโรคตับจากแอลกอฮอล์ที่ส่วนใหญ่จะมีภาวะติด แอลกอฮอล์ (alcoholism) ส่งผลให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่ให้ความร่วมมือในการรักษา (non-compliance) ส่วน ใหญ่ไม่หยุดดื่มแอลกอฮอล์ในขณะรักษา ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกข้าวมีแนวโน้ม ลดระดับเอนไซม์ ALT และ AST ในหมูที่เกิดภาวะตับอักเสบและยังคงได้รับเอนทานอลได้ดี และสารสกัด

หัญชาตอกขาวในขนาดสูง 500 mg/kg สามารถลดระดับเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้สารสกัดหัญชาตอกขาวสามารถลดระดับเอนไซม์ LDH ได้ดีด้วย แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหัญชาตอกขาวช่วยชะลอหรือป้องกันการทำลายเซลล์ในตับได้ ด้านกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหัญชาตอกขาวมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหัญชาตอกขาวต้านอนุมูลอิสระ (Pratheesh Kumar and Kuttan, 2009; Rajamurugan et al., 2011) และมีฤทธิ์ลดหลั่งสารก่อการอักเสบ cytokines หรือลดการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Pratheeshkumar and Kuttan, 2011b; Pratheeshkumar and Kuttan, 2012; Youn et al., 2012) รวมทั้งมีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียและเซลล์มะเร็ง (Chea et al., 2006; Gupta et al., 2003) ใน การศึกษานี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหัญชาตอกขาวต่อภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นในหมูที่ได้ออกงานออล เมื่อทดสอบจากไมโครโซนจากตับหมูในแต่ละกลุ่มพบว่า สารสกัดหัญชาตอกขาวสามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระ และลดภาวะ oxidative stress ได้ดี เป็นหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหัญชาตอกขาวที่ช่วยชะลอภาวะตับอักเสบ และในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดหัญชาตอกขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ silymarin ซึ่งปัจจุบันใช้เป็นหนึ่งในยาที่ใช้รักษาโรคตับอักเสบ ในหลายกรณีศึกษาพบว่า silymarin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านอักเสบได้ดี (Saller et al., 2007) และมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคตับที่มาจากการแพ้ต่างๆ ทั้งจากการติดเชื้อไวรัส การได้รับสารพิษต่างๆ และโรคตับจากแอลกอฮอล์ (Saller et al., 2001; Vargas-Mendoza et al., 2014; Zhang et al., 2013) ในการศึกษานี้พบว่า silymarin มีฤทธิ์ลดการสร้างอนุมูลอิสระได้ดีและลดภาวะ oxidative stress ในหมูที่ได้รับอาหารออลต่อเนื่องได้ เช่น กัน อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาทางคลินิกได้แสดงผลขัดแย้งในด้านประสิทธิภาพการรักษาหรือช่วยลดภาวะโรคตับของ silymarin โดยพบว่า silymarin ไม่สามารถลดระดับเอนไซม์ AST หรือ ALT ได้ และไม่สามารถลดอัตราการเสียชีวิตหรือการดำเนินของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้ยาหลอก (placebo) (Feher and Lengyel, 2012; Saller et al., 2008) ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า silymarin ในขนาดที่ใช้ในการรักษา ไม่มีผลลดระดับเอนไซม์ ALT และมีผลลดระดับ AST ได้บ้างในหมูที่มีภาวะตับอักเสบร่วมกับการได้รับอาหารออล แม้ว่า silymarin จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีแต่ประสิทธิภาพในการช่วยลดภาวะโรคตับจากแอลกอฮอล์ยังไม่ชัดเจน ฉะนั้นการใช้ silymarin ในการรักษาโรคตับในทางสัตว์ทดลองและในทางคลินิกยังคงมีข้อมูลที่ขัดแย้งกัน จึงจำเป็นจะต้องมีการติดตามการใช้ยาต่อไป

การศึกษาด้านความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ของสารสกัดหัญชาตอกขาวนั้น รายงานก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากหัญชาตอกขาวค่อนข้างปลอดภัย เมื่อทำการทดสอบพิษเฉียบพลันในหมูขาวเล็ก (mice) พบว่าสารสกัดหัญชาตอกขาวในขนาดสูงไม่ทำให้หมูขาวเล็กตาย รวมทั้งไม่เปลี่ยนแปลงการทำงานของอวัยวะสำคัญต่างๆ ในร่างกาย และเมื่อทดสอบด้วย brine shrimp lethality พบว่าสารสกัดมีค่าไม่มีความเป็นพิษ (Latha et al., 2010) สำหรับผลจากการศึกษาครั้งนี้ได้ยืนยันความปลอดภัยของสารสกัดหัญชาตอกขาวในน้ำ ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อหมูขาวใหญ่ (rat) ทั้งในหมูปกติและหมูที่เกิดภาวะตับอักเสบจากอาหารออล และไม่เกิดพิษต่อการทำงานของตับ อย่างไรก็ตามศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดหัญชาตอกขาวในขนาดสูงมีแนวโน้มเพิ่มระดับของเอนไซม์ ALP ซึ่งอาจจะชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหัญชาตอกขาวจะมีความเป็นพิษต่อถุงน้ำดี

## สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ลดการทำลายตับในหมูที่มีภาวะตับอักเสบจากการได้รับเอทานอลในขนาดสูงและติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ในการประเมินทางคลินิกจะประเมินจากการวัดระดับเอนไซม์เกี่ยวกับตับ Alanine transminase (ALT) และ aspartate transminase (AST) ที่มีระดับเอนไซม์เพิ่มขึ้นในพลาสม่า หมูขาวที่ได้รับเอทานอลต่อเนื่องในการศึกษาครั้งนี้ มีการจำลองพยาธิสภาพคล้ายกับผู้ป่วยโรคตับจากแอลกอฮอล์ จึงสามารถใช้เป็นโมเดลสัตว์ทดลอง (*in vivo model*) ในการศึกษาภาวะตับอักเสบจากแอลกอฮอล์ได้ดี ผลการทดสอบสารสกัดหญ้าดอกขาวพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ลดระดับเอนไซม์ ALT และ AST ได้ดีในหมูที่มีภาวะตับอักเสบร่วมกับการได้รับเอทานอล และสารสกัดหญ้าดอกขาวสามารถลดการสร้างอนุมูลิสระในไมโครโซนตับหมูเกิดภาวะตับอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจจะเป็นหนึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวในการช่วยการชะลอและป้องการดำเนินของโรคตับจากแอลกอฮอล์ หญ้าดอกขาวจึงสามารถลดการทำลายหรือช่วยลดภาวะตับอักเสบจากแอลกอฮอล์หรือโรคตับจากแอลกอฮอล์ได้ และมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคตับต่อไป ผลจากการศึกษานี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในสัตว์ทดลองและทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นเท่านั้น จึงจำเป็นจะต้องมี การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่ลึกซึ้งและทดสอบความเป็นพิษแบบเรื้อรัง รวมทั้งการทดสอบประสิทธิภาพการรักษาในทางคลินิกต่อไป



## เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- Arteel, G., L. Marsano, C. Mendez, F. Bentley, and C.J. McClain. 2003. Advances in alcoholic liver disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 17:625-647.
- Chea, A., S. Hout, C. Long, L. Marcourt, R. Faure, N. Azas, and R. Elias. 2006. Antimalarial activity of sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerea*. *Chem Pharm Bull*. 54:1437-1439.
- Day, C.P. 2007. Treatment of alcoholic liver disease. *Liver Transplantation*. 13:S69-S75.
- Feher, J., and G. Lengyel. 2012. Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. 13:210-217.
- Gramenzi, A., F. Caputo, M. Biselli, F. Kuria, E. Loggi, P. Andreone, and M. Bernardi. 2006. Review article: alcoholic liver disease; pathophysiological aspects and risk factors. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 24:1151-1161.
- Gupta, M., U.K. Mazumder, L. Manikandan, P.K. Haldar, S. Bhattacharya, and C.C. Kandar. 2003. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. *Fitoterapia*. 74:148-150.
- Heidelbaugh J, B.M. 2006. Cirrhosis and chronic liver failure: Part I. Diagnosis and evaluation. *American Family Physician*. 74:756-762.
- Helmut, K.S., S.L. Charles, S. Felix, S. Mikko, S. Hans-Peter, and H. Yoshimori. 2005. Alcoholic Liver Disease: From Pathophysiology to Therapy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 29:1276-1281.
- Iwalewa, E.O., Iwalewa O.J., and Adeboye J.O.. 2003. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. *Journal of Ethnopharmacology*. 86:229-234.
- Kirkitar, K.R. 1975. Indian Medicinal Plant.
- Koo, H.N., Hong S.H., Jeong H.J., Lee E.H., Kim N.G., Choi S.D., Ra K.W., Kim K.S., Kang B.K., Kim J.J., Oh, J.G. and Kim H.M.. 2002. Inhibitory effect of Artemisia capillaris of ethanol-induced cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) secretion in HepG2 cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 24:441.
- Kuo, Y.H., Kuo Y.J., Yu A.S., Wu, M.D. Ong C.W., Yang Kuo L.M., Huang J.T., Chen, C.F. and Li S.Y.. 2003. Two Novel Sesquiterpene Lactones, Cytotoxic Vernolide-A and -B, from *Vernonia cinerea*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 51:425-426.
- Latha, L.Y., I. Darah, K. Jain, and S. Sasidharan. 2010. Toxicity study of *Vernonia cinerea*. *Pharm Biol*. 48:101-104.
- Latha, R.M., T. Geetha, and P. Varalakshmi. 1998. Effect of *Vernonia cinerea* Less Flower Extract in Adjuvant-Induced Arthritis. *General Pharmacology*. 31:601-606.
- Leelarungrayub, D., S. Pratanaphon, P. Pothongsunun, T. Sriboonreung, A. Yankai, and R. Bloomer. 2010. *Vernonia cinerea* Less. supplementation and strenuous exercise reduce smoking rate: relation to oxidative stress status and beta-endorphin release in active smokers. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 7:21.
- Leoni S, P.F., Righini R, Bolondi L. 2006. Management of small hepatocellular carcinoma. *Acta Gastroenterol Belg*. 69(2):230-235.
- Lieber, C.S. 2004. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*. 34:9-19.
- Lieber, C.S. 2005a. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*. 9:1-35.
- Lieber, C.S. 2005b. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Roczn Akad Med Bialymst*. 50:7-20.
- Lucey, M.R., P. Mathurin, and T.R. Morgan. 2009. Alcoholic Hepatitis. *The New England Journal of Medicine*. 360:2758-2769.
- Malaya Gupta, 2003. Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. *Phytotherapy Research*. 17:804-806.

- Mandrekar, P., and G. Szabo. 2009. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol.* 50:1258-1266.
- O'Shea, R.S., S. Dasarathy, and A.J. McCullough. 2010. Alcoholic liver disease. *Hepatology.* 51:307-328.
- Pramyothin, P., H. Chirdchupunsare, A. Rungsipipat, and C. Chaichantipyuth. 2005. Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn extract in rats treated with ethanol: In vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology.* 102:408-411.
- Pramyothin, P., P. Samosorn, S. Poungshompoon, and C. Chaichantipyuth. 2006. The protective effects of *Phyllanthus emblica* Linn. extract on ethanol induced rat hepatic injury. *Journal of Ethnopharmacology.* 107:361-364.
- Pratheesh Kumar, P., and G. Kuttan. 2009. *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 31:94-102.
- Pratheeshkumar, P., and G. Kuttan. 2011a. Effect of vernolide-A, a sesquiterpene lactone from *Vernonia cinerea* L., on cell-mediated immune response in B16F-10 metastatic melanoma-bearing mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 33:533-538.
- Pratheeshkumar, P., and G. Kuttan. 2011b. Vernolide-A, a sesquiterpene lactone from *Vernonia cinerea*, induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by modulating p53 and caspase-3 gene expressions and regulating NF-KB-mediated bcl-2 activation. *Drug and Chemical Toxicology.* 34:261-270.
- Pratheeshkumar, P., and G. Kuttan. 2012. Modulation of cytotoxic T lymphocyte, natural killer cell, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity by *Vernonia cinerea* L. and vernolide-A in BALB/c mice via enhanced production of cytokines IL-2 and IFN- $\gamma$ . *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 34:46-55.
- Rajamurugan, R., N. Selvaganabathy, S. Kumaravel, C. Ramamurthy, V. Sujatha, M. Suresh Kumar, and C. Thirunavukkarasu. 2011. Identification, quantification of bioactive constituents, evaluation of antioxidant and in vivo acute toxicity property from the methanol extract of *Vernonia cinerea* leaf extract. *Pharm Biol.* 49:1311-1320.
- Saller, R., R. Brignoli, J. Melzer, and R. Meier. 2008. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplementmed.* 15:9-20.
- Saller, R., R. Meier, and R. Brignoli. 2001. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs.* 61:2035-2063.
- Saller, R., J. Melzer, J. Reichling, R. Brignoli, and R. Meier. 2007. An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Forsch Komplementmed.* 14:70-80.
- Seth, D., P.S. Haber, W.K. Syn, A.M. Diehl, and C.P. Day. 2011. Pathogenesis of alcohol-induced liver disease: classical concepts and recent advances. *J Gastroenterol Hepatol.* 26:1089-1105.
- Sougioultsis, S., E. Dalakas, P.C. Hayes, and J.N. Plevris. 2005. Alcoholic hepatitis: from pathogenesis to treatment. *Current Medical Research and Opinion.* 21:1337.
- Torruellas, C., S.W. French, and V. Medici. 2014. Diagnosis of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014 Sep 7;20(33):11684-11699.
- Toyang, N.J., and R. Verpoorte. 2013. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology.* 146:681-723.
- Vargas-Mendoza, N., E. Madrigal-Santillan, A. Morales-Gonzalez, J. Esquivel-Soto, C. Esquivel-Chirino, Y.G.-R.M. Garcia-Luna, J.A. Gayoso-de-Lucio, and J.A. Morales-Gonzalez. 2014. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol.* 6:144-149.
- Wongwiwatthanakit, S., P. Benjanakaskul, T. Songsak, S. Suwanamajo, and V. Verachai. 2009. Effectiveness of *Vernonia cinerea* for smoking cessation. *Journal of Health Research.* 23:31-36.

- Yoga Latha, L., Jr., I. Darah, S. Sasidharan, and K. Jain. 2009. Antimicrobial Activity of *Emilia sonchifolia* DC., *Tridax procumbens* L. and *Vernonia cinerea* L. of Asteracea Family: Potential as Food Preservatives. *Malays J Nutr.* 15:223-231.
- Youn, U.J., E.-J. Park, T.P. Kondratyuk, C.J. Simmons, R.P. Borris, P. Tanamatayarat, S. Wongwiwatthanakit, O. Toyama, T. Songsak, J.M. Pezzuto, and L.C. Chang. 2012. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of *Vernonia cinerea*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 22:5559-5562.
- Zhang, W., R. Hong, and T. Tian. 2013. Silymarin's Protective Effects and Possible Mechanisms on Alcoholic Fatty Liver for Rats. *Biomol Ther.* 21:264-269.





## ผลสำเร็จที่ได้จากการ

ผลสำเร็จเบื้องต้น จากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหญ้าดอกข้าว *Vernonia cinerea* Less. มีฤทธิ์ลดการทำลายตับในสัตว์ทดลองที่เกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรังจากเอทานอลได้ และสารสกัดหญ้าดอกข้าว ไม่มีความเป็นพิษเดียบพลันต่อสัตว์ทดลองทั้งในภาวะปกติและภาวะตับอักเสบ

ผลสำเร็จกึ่งคลาส การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกข้าวด้วยน้ำ (water crude extract) โดยพบว่าสารสกัดหญ้าดอกข้าวมีกลไกการออกฤทธิ์โดยสามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระและลดภาวะ oxidative stress ในเนื้อเยื่อตับอักเสบที่เกิดจากเอทานอลได้ดี และทราบขนาด (dose) ของสารสกัดที่จะสามารถนำมาใช้ศึกษาต่อเนื่องในระดับคลินิกหรือในผู้ป่วยโรคตับอักเสบต่อไป และมุ่งไปสู่การพัฒนาเป็นยาสมุนไพรมาตรฐานสำหรับโรคตับจากแอลกอฮอล์ต่อไป

## ผลผลิตที่ได้จากการ

การนำเสนอผลการวิจัย ในรูปแบบโปสเตอร์และปากเปล่าในการสัมมนาระดับบัณฑิตศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ เพื่อถ่ายทอดความรู้ที่ได้จากการวิจัยแก่คณาจารย์ เภสัชกร นิสิตระดับบัณฑิตศึกษาของคณะฯ และ การนำเสนอรูปแบบโปสเตอร์และตีพิมพ์ Proceeding ในงานประชุมระดับนานาชาติ The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting 20-22 March, 2013 . Phitsanulok, Thailand. เรื่อง Effect of *Vernonia cinerea* Less water extract on alcohol stimulated rats.

**F37****Effect of *Vernonia cinerea* Less. Water Extract on Alcohol Stimulated-Rats****Thitiya Sanpundorn\***, Nanteetip Limpeanchob, Sakonwun Praputbut

<sup>1</sup>Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand  
E-mail: kook\_thitiya@hotmail.com, Sakonwuns@nu.ac.th

**Abstract**

Alcoholic liver disease (ALD) is one major public health problem caused by excessive alcohol consumption. The complex inflammatory pathogenesis of ALD lead to hepatic damages as measured by elevated serum liver function enzymes. *Vernonia cinerea* Less (VE) is an herbal plant possesses anti-inflammatory and antioxidant properties. This study aims to investigate the effect of VE water extract on alcohol-stimulated rats. Male Sprague-Dawley rats were intubated with 4-6 g/kg alcohol for 60 days to induce chronic hepatic toxicity. The alcohol-induced toxicity rats were divided to treat with VE (125, 250, 500 mg/kg), silymarin and phosphate saline buffer (PBS) for another 45 days. Rat blood was collected from tail vein. Serums were measured for liver function enzymes: alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) by enzymatic assay kits. The results showed that rats received ethanol orally for sixty days continuously increase the levels of ALT and AST, comparing with the control group. In the other hand, rats received glucose with caloric equivalence to the ethanol showed minimal changes of the enzyme levels. We found that VE extracts trend to decrease the enzymes liver function enzymes whereas silymarin did not have any effect on the enzyme levels. Moreover, 250 mg/kg VE can decreases ALT levels significantly. Therefore, VE might be one potential herbal as a hepatoprotective agent used in ALD.

**Keywords:** Alcoholic liver disease, Alcohol, Transaminase, *Vernonia cinerea*

**Introduction**

Excessive exposure of alcohol leads to alcoholism known to cause alcoholic liver disease (ALD). The ALD is the spectrum of liver injuries associated with acute and chronic inflammations. A wide range of liver pathological process includes steatosis (fatty liver), hepatitis and cirrhosis (1). Mechanism of liver injury composes of alcohol metabolism, oxidative stress, cytokines/inflammatory mediators, genetic factors and the interactions of these factors (2). There are multiple potential overlapping mechanisms for liver injury in ALD (1,2). When the liver damaged, two important transaminase enzymes: alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) are elevated. An elevated serum AST in relation to serum ALT has been proposed as an indicator for ALD (3,4). Moreover, serum lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) enzymes increased are also raised in the tissue injuries (5). There is no FDA-approved therapy for any aspect of ALD. Recently, herbal therapy has been interested in as an alternative treatment for ALD. *Vernonia cinerea* Linn (VE) a perennial herbaceous plant in family Asteraceae mainly is distributed in the tropical regions and commonly found in Southeast Asia. Different parts of the plant have different therapeutic values. There are studies of the potential effects of VE on malaria fever, worms, pain, infections, diuresis, cancer and various gastrointestinal disorders (6-9). Nowadays, VE are used for nicotine abstinence in smoking patients (10). VE extract was shown to have antioxidant, anti-inflammatory, and down regulating pro-inflammatory cytokines properties (11-13). The aim of this study was to investigate the effect of VE water extract on alcohol-induced toxicity rats. It is possible that the effect of VE might be beneficial on ALD.

**Materials and Methods****Animal experiments**

Male Sprague-Dawley rats (180-200 g) were purchased from the National Laboratory Animal Centre, Mahidol University. The rats were housed in the animal room with 12 hours light-dark cycle, and controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). The rats were fed with regular diet and water ad libitum. Animal handling and experiments reported here were approved by the Ethical Committee for the Use of Animal, Naresuan University. Rats were divided into the control group (normal rats fed with PBS), glucose group (the rats received glucose as the isocaloric equivalence) and the alcohol-induced toxicity rats. The ethanol-stimulated rats were daily gastric intubated with ethanol for 60 days. The first and second week, rats were received 4 and 5 g/kg/day ethanol respectively and then after that 6 g/kg/day ethanol was fed into rats throughout 60 days. The ethanol-induced toxicity rats were continuously fed with ethanol and divided into 7 groups for treatment of various concentrations of VE water extracts (125, 250 and 500 mg/kg/day), silymarin (100 mg/kg/day) and PBS for another 45 days. Fasting blood was collected at baseline and every 2 weeks after treatment from the tail vein to measure serum liver functions enzymes levels. Body weight and food consumption were regularly recorded during the experimental period.

### Measurement of liver functions enzymes level

During experiment, rat serums were measured for liver function enzymes: AST, ALT, ALP and LDH by enzymatic assay kit (Human™). The kinetic method was used for the determination of AST, ALT, ALP and LDH activities by spectrophotometer. The AST, ALT, ALP and LDH activities were calculated using the formulations to calculate enzyme activities.

### Statistical analysis

All data will be presented as means  $\pm$  standard deviation (SD). The mean values of the various treatment groups were compared using ANOVA or student t-test. Differences will be considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

### Results

Rats were received ethanol orally for sixty days and rat blood was collected every two weeks. The results showed that the liver function enzymes: AST and ALT levels are continuously increased. At the 60<sup>th</sup> day, both AST and ALT enzyme levels were significantly increased, comparing with the control group. These indicated the hepatotoxicity (Figure 1). Serum levels of ALP and especially LDH tended to be increased but there was no significance, comparing with the control group (Figure 2). In the other hand, rats received glucose with caloric equivalence to the ethanol showed minimal changes. The chronic ethanol-stimulated rats were further received PBS, silymarin and 125, 250, 500 mg/kg/day VE water extracts for another 45 days. The VE extracts are seemed to reduce the liver function enzymes: AST and ALT levels in the ethanol-stimulated toxicity rats when compare to the hepatotoxic rats received PBS (Figure 3 and 4). There were minimal changes of the LDH levels a (Figure 5) as well as the APS enzyme levels (data not shown). We noticed that 250 mg/kg VE decreases ALT levels significantly (Figure 4) whereas silymarin did not have any effect on both enzyme levels after the 45 days of treatment.

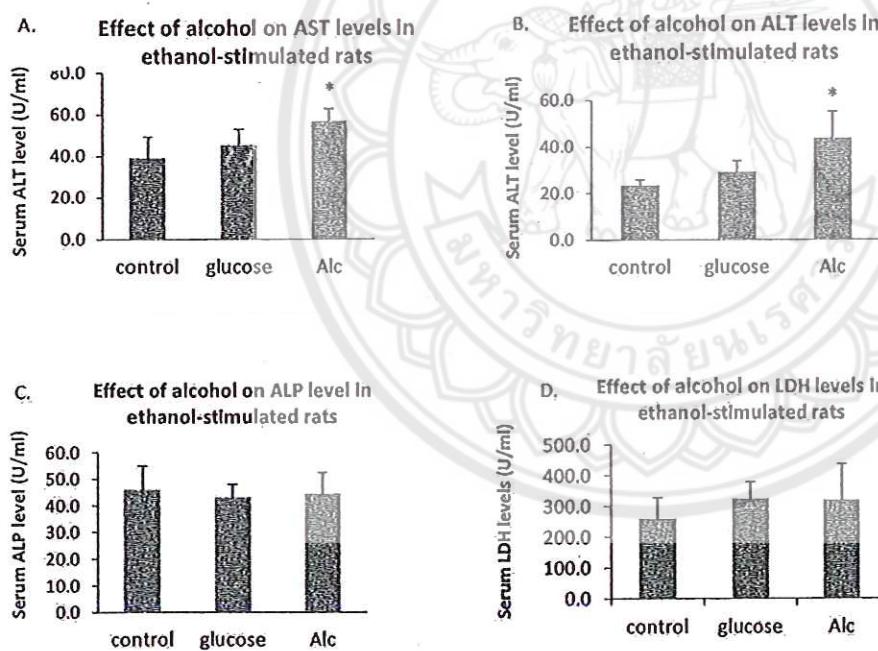


Figure 1. Effects of alcohol on serum liver function enzymes: AST (A.) and ALT (B.) levels (U/mL) in ethanol-stimulated rats after 60 days. The data is shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). \*,  $p \leq 0.05$  is statistic significant, compared to the control (control: rats were fed with PBS, glucose:rats were received glucose, Alc:rats were received 6 g/kg/day alcohol.)

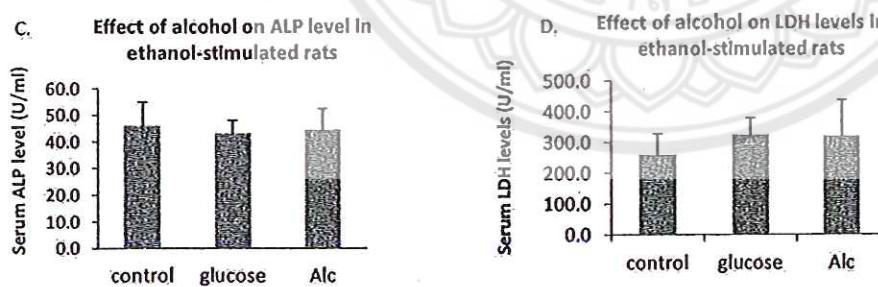


Figure 2. Effect of alcohol on serum liver ALP (C.) and LDH (D) levels (U/mL) in ethanol-stimulated rats after 60 days. The data is shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). \*,  $p \leq 0.05$  is statistic significant, compared to the control (control:rats were fed with PBS, glucose:rats were received glucose, Alc: rats were received 6 g/kg/day alcohol.)

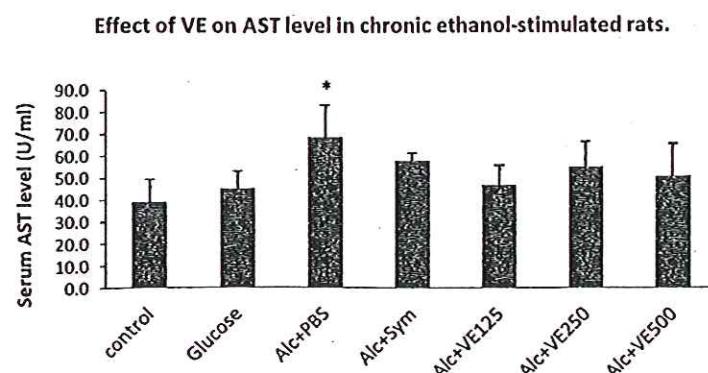
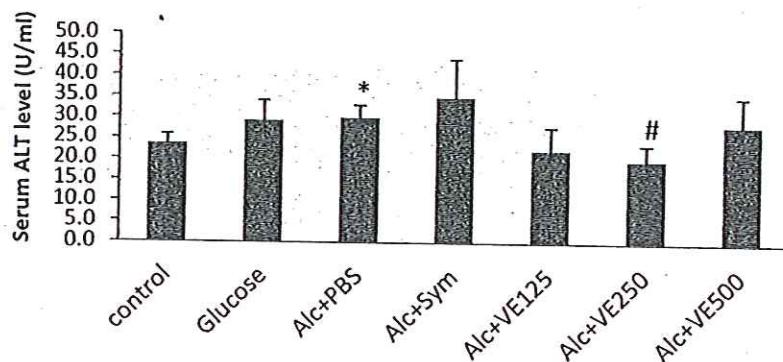
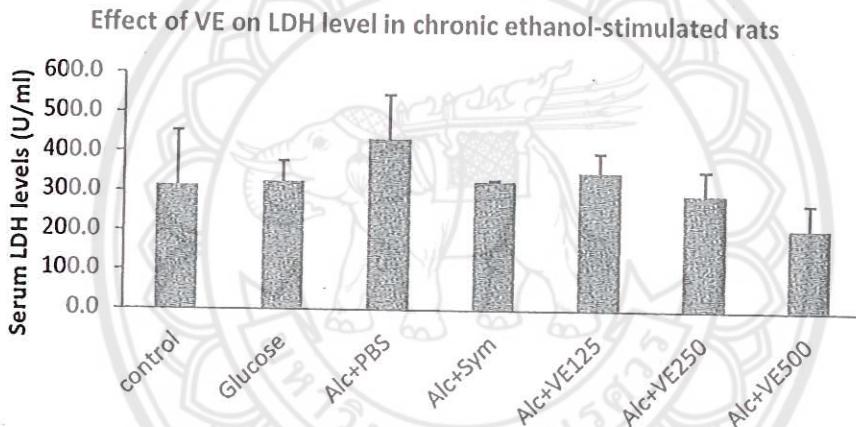


Figure 3. Effects of *Vernonia cinerea* (VE) extracts on AST level in chronic ethanol-stimulated rats. The data is shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3-6$ ). \*,  $p \leq 0.05$  is statistic significant, compared to the control. #  $p \leq 0.05$  is statistic significant, compared to the ethanol-stimulated group (control:rats were fed with PBS, glucose: rats were received glucose, Alc+PBS: rats were received alcohol and PBS, Alc+Sym: rats were received alcohol and 100 mg/kg/day silymarin, Alc+VE125, VE 250, VE 500: rats were received alcohol and 125, 250, and 500 mg/kg/day, respectively).

#### Effect of VE on ALT level in chronic ethanol-stimulated rats.



**Figure 4.** Effects of *Vernonia cinerea* (VE) extracts on ALT level in chronic ethanol-stimulated rats. The data is shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3-6$ ). \*,  $p \leq 0.05$  is statistic significant, compared to the control. #,  $p \leq 0.05$  is statistic significant, compared to the ethanol-stimulated group (control:rats were fed with PBS, glucose:rats were received glucose, Alc+PBS:rats were received alcohol and PBS, Alc+Sym:rats were received alcohol and 100 mg/kg/day silymarin, Alc+VE125, VE 250, VE 500: rats were received alcohol and 125, 250, and 500 mg/kg/day respectively).



**Figure 5.** Effects of *Vernonia cinerea* (VE) extracts on LDH level in chronic ethanol-stimulated rats. The data is shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3-6$ ). \*,  $p \leq 0.05$  is statistic significant, compared to the control. #,  $p \leq 0.05$  is statistic significant, compared to the ethanol-stimulated group (control:rats were fed with PBS, glucose: rats were received glucose, Alc+PBS:rats were received alcohol and PBS, Alc+Sym:rats were received alcohol and 100 mg/kg/day silymarin, Alc+VE125, VE 250, VE 500: rats were received alcohol and 125, 250, and 500 mg/kg/day, respectively.)

#### Discussion

Long term and high alcohol consumption is one of the most common causes of liver disease. The pathological processes of ALD are involved direct toxicity from alcohol and its metabolites, complex inflammatory pathway, and free radical formations (2,14). An elevated serum AST in relation to serum ALT has been clinical indicators for alcohol induced organ damages (3). This study has demonstrated that rats received high dose ethanol for 60 days shows the increases of liver function enzymes significantly, indicating alcohol induced hepatotoxicity. Our study model would be similar to chronic alcoholism and leading to ALD in the patients. Serum levels of ALP and LDH may be increased during tissue injuries (5). We also measured ALP and LDH enzyme levels. The enzyme levels seemed to be increased; however, there was no significant change in our study. Both ALP and LDH are less specific and sensitive to liver cell necrosis and they might be increased mostly during extensive damages.

VE extracts have been shown to possess antioxidant, anti-inflammatory activity and down regulates pro-inflammatory cytokines in animal models (11,12). We investigated the direct effect of VE water extract on alcohol stimulated-toxicity rats and our study showed that VE trended to reduce alcoholic liver toxicity. VE could decrease ALT levels which is the sensitive and specific marker for liver cell damages. Silymarin is alternative therapy popular used in hepatitis but the pharmacological mechanism of silymarin in ALD is still controversial (15). Silymarin did not have effect on the liver enzyme levels in this study. We found that VE extract could modulate ethanol-induced toxicity in rats. It is needed to continue further study.

## Conclusion

Long term exposure to alcohol induced liver damages in rats by demonstrating the increase of the liver function enzyme levels and VE water extracts could reduce the production of ALT enzyme. Therefore, the VE extracts might be beneficial on ALD.

## References

1. O'Shea, R.S., S. Dasarathy, and A.J. McCullough. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010; 51:307-328.
2. Shukla, S.D., S.B. Pruitt, G. Szabo, and G.E. Arteel. Binge Ethanol and Liver: New Molecular Developments. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*:n/a-n/a. 2013.
3. McClain, C.J., Z. Song, S.S. Barve, D.B. Hill, and I. Deaciuc. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004; 287:G497-G502.
4. Thapa, B.R., and A. Walia. Liver function tests and their interpretation. *Indian J Pediatr*. 2007; 74:663-671.
5. Reichling, J.J., and M.M. Kaplan. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 1988; 33:1601-1614.
6. Chea, A., S. Hout, C. Long, L. Marcourt, R. Faure, N. Azas, and R. Elias. Antimalarial Activity of Sesquiterpene Lactones from Vernonia cinerea. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2006; 54:1437-1439.
7. Gupta, M., U.K. Mazumder, L. Manikandan, P.K. Haldar, S. Bhattacharya, and C.C. Kandar. Antibacterial activity of Vernonia cinerea. *Fitoterapia*. 2003; 74:148-150.
8. Iwalewa, E.O., O.J. Iwalewa, and J.O. Adeboye. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of Vernonia cinerea less leaf. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 86:229-234.
9. Latha, R.M., T. Geetha, and P. Varalakshmi. Effect of Vernonia cinerea Less Flower Extract in Adjuvant-Induced Arthritis. *General Pharmacology*. 1998; 31:601-606.
10. Wongwiwatthanakit, S., P. Benjanakaskul, T. Songsak, S. Suwanamajo, and V. Verachai. Effectiveness of Vernonia cinerea for smoking cessation. *Journal of Health Research*. 2009; 23:31-36.
11. Pratheesh Kumar, P., and G. Kuttan. Vernonia cinerea L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2009; 31:94-102.
12. Pratheeshkumar, P., and G. Kuttan. Modulation of immune response by Vernonia cinerea L. inhibits the proinflammatory cytokine profile, iNOS, and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2011a; 33:73-83.
13. Pratheeshkumar, P., and G. Kuttan. Protective role of Vernonia cinerea L. against gamma radiation-induced immunosuppression and oxidative stress in mice. *Human & Experimental Toxicology*. 2011b; 30:1022-1038.
14. Lefkowitch, J.H. Morphology of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*. 2005; 9:37-53.
15. Fraschini F, D.G., Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clin Drug Invest*. 2002; 22(1):51-65.



## Effect of *Vernonia cinerea* Less. Water Extract on Alcohol Stimulated-Rats



Thitiya Sanpundorn<sup>1\*</sup>, Nanteetip Limpeanchob<sup>1</sup>, Sakonwun Praputbut<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000 Thailand

\*Email : kook\_thitiya@hotmail.com, Sakonwuns@nu.ac.th

### Abstract

Alcoholic liver disease (ALD) is one major public health problem caused by excessive alcohol consumption. The complex inflammatory pathogenesis of ALD lead to hepatic damages as measured by elevated serum liver function enzymes. *Vernonia cinerea* Less. (VE) is an herbal plant possesses anti-inflammatory and antioxidant properties. This study aims to investigate the effect of VE water extract on alcohol-stimulated rats. Male Sprague-Dawley rats were intubated with 4-6 g/kg alcohol for 60 days to induce chronic hepatic toxicity. The alcohol-induced toxicity rats were divided to treat with VE (125, 250, 500 mg/kg), silymarin and phosphate saline buffer (PBS) for another 45 days. Rat blood was collected from tail vein. Serums were measured for liver function enzymes: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) by enzymatic assay kits. The results showed that rats received ethanol orally for sixty days continuously increase the levels of ALT and AST, comparing with the control group. In the other hand, rats received glucose with caloric equivalence to the ethanol showed minimal changes of the enzyme levels. We found that VE extracts trend to decrease the enzymes liver function enzymes whereas silymarin did not have any effect on the enzyme levels. Moreover, 250 mg/kg VE can decreases ALT levels significantly. Therefore, VE might be one potential herbal as a hepatoprotective agent used in ALD.

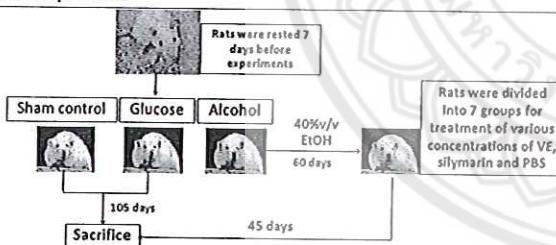
### Introduction and objectives

Excessive exposure of alcohol leads to alcoholism known to cause alcoholic liver disease (ALD). The ALD is the spectrum of liver injuries associated with acute and chronic inflammations. A wide range of liver pathological process includes steatosis (fatty liver), hepatitis and cirrhosis (1). Mechanism of liver injury comprises of alcohol metabolism, oxidative stress, cytokines/inflammatory mediators, genetic factors and the interactions of these factors (2). There are multiple potential overlapping mechanisms for liver injury in ALD (1,2). When the liver damaged, two important transaminase enzymes: alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) are elevated. An elevated serum AST in relation to serum ALT has been proposed as an indicator for ALD (3,4). Moreover, serum lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) enzymes increased are also raised in the tissue injuries (5). There is no FDA-approved therapy for any aspect of ALD. Recently, herbal therapy has been interested in as an alternative treatment for ALD. *Vernonia cinerea* Linn (VE) a perennial herbaceous plant in family Asteraceae mainly is distributed in the tropical regions and commonly found in Southeast Asia. Different parts of the plant have different therapeutic values. There are studies of the potential effects of VE on malaria fever, worms, pain, infections, diuresis, cancer and various gastrointestinal disorders (6,7,8,9).

Nowadays, VE are used for nicotine abstinence in smoking patients (10). VE extract was shown to have antioxidant, anti-inflammatory, and down regulating pro-inflammatory cytokines properties (11,12,13). The aim of this study was to investigate the effect of VE water extract on alcohol-induced toxicity rats. It is possible that the effect of VE might be beneficial on ALD.

### Methodology

#### - Animal experiments



#### - Measurement of liver functions enzyme level

During experiment, rat serums were measured for liver function enzymes AST, ALT, ALP and LDH by enzymatic assay kit (Human™). The kinetic method was used for the determination of AST, ALT, ALP and LDH activities by spectrophotometer. The AST, ALT, ALP and LDH activities were calculated using the formulations to calculate enzyme activities.

#### - Statistical analysis

All data will be presented as means  $\pm$  standard deviation (SD). The mean values of the various treatment groups were compared using ANOVA or student t-test. Differences will be considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

### References

- O'Shea, R.S., S. Dusyam, and A.J. McCullough. Alcoholic Liver Disease. Hepatology. 2010;51:307-328.
- Shah, S.D., S.B. Prent, O. Szabo, and O.E. Arsel. Biog-Ethanol and Liver: New Molecular Developments. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2006;30:18-24.
- McClellan, C., Z. Soe, S.S. Berry, D.B. Hilt, and J. Desirée. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 2004;287:0497-0502.
- Thapa, B.R., and A. Walsh. Liver function tests and their interpretation. Indian J Pediatr. 2007;74:653-671.
- Reichling, J.J., and A. Wichtl. Clinical use of some monoterpenes in liver diseases. Digestive Diseases and Sciences. 1991;36:1601-1614.
- Cheu, A., S. Host, C. Long, L. Marcourt, R. Ferre, N. Azza, and R. Elias. Antimicrobial Activity of Sesquiterpene Lactones From *Vernonia cinerea*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 2006;54:1437-1439.
- Gupta, M., U.M. Mammen, L. Manikandan, P.K. Haldar, S. Bhattacharya, and C.C. Kanwar. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. Folia Microbiol. 2003;48:141-159.
- Ishak, E.O., O.J. Isakow, and J.O. Adeloye. Analgésic, antipyretic, and anti-inflammatory effects of ephedrol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea*. Journal of Health Research. 2009;23:31-34.
- Wongvanshanavikit, S., P. Benjatastadit, T. Songkak, S. Suwanamaj, and V. Verakai. Effectiveness of *Vernonia cinerea* for smoking cessation. Journal of Health Research. 2009;23:31-34.
- Pradeeb Kumar, P., and O. Kumar. *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carbon tetrachloride induced paw edema model. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2009;31:94-102.
- Pradeeb Kumar, P., and O. Kumar. Modulation of immune response by *Vernonia cinerea* L. inhibits the proinflammatory cytokine profile, iNOS, and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2011;33:73-83.
- Pradeeb Kumar, P., and O. Kumar. Protective role of *Vernonia cinerea* L. against gamma radiation-induced immunosuppression and oxidative stress in mice. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2011;33:1022-1031.
- Lebowitz, J.H. Morphological toxicologic disease. Clin Liver Dis. 2005;9:37-53.
- Fischini, F.D.O. Esposi D. Pharmacology of silymarin. Clin Drug Invest. 2007;27(1):31-43.

### Results and discussion

Rats were received ethanol orally for sixty days and rat blood was collected every two weeks. The results showed that the liver function enzymes: AST and ALT levels are continuously increased. At the 60th day, both AST and ALT enzyme levels were significantly increased, comparing with the control group. These indicated the hepatotoxicity (figure 1). Serum levels of ALP and especially LDH tended to be increased but there was no significance, comparing with the control group (figure 1). In the other hand, rats received glucose with caloric equivalence to the ethanol showed minimal changes. The chronic ethanol-stimulated rats were further received PBS, silymarin and 125, 250, 500 mg/kg/day VE water extracts for another 45 days. The VE extracts are seemed to reduce the liver function enzymes: AST and ALT levels in the ethanol-stimulated toxicity rats when compare to the hepatotoxic rats received PBS (figure 2). There were minimal changes of the LDH levels a (figure 2) as well as the ALP enzyme levels (data not shown). We noticed that 250 mg/kg VE decreases ALT levels significantly (figure 2) whereas silymarin did not have any effect on both enzyme levels after the 45 days of treatment.

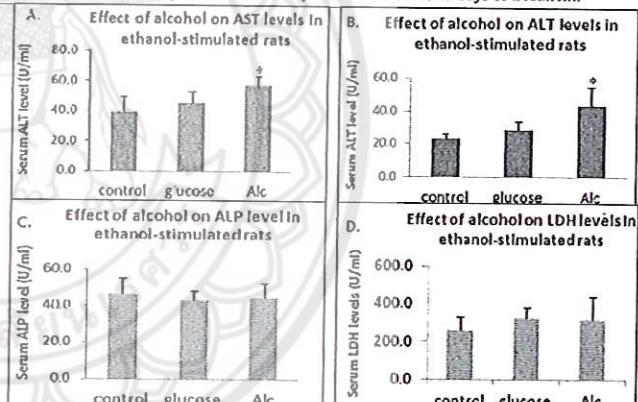


Figure 1. Effects of alcohol on serum liver function enzymes: AST (A.), ALT (B.), ALP (C) and LDH (D) levels (U/ml) in ethanol-stimulated rats after 60 days.

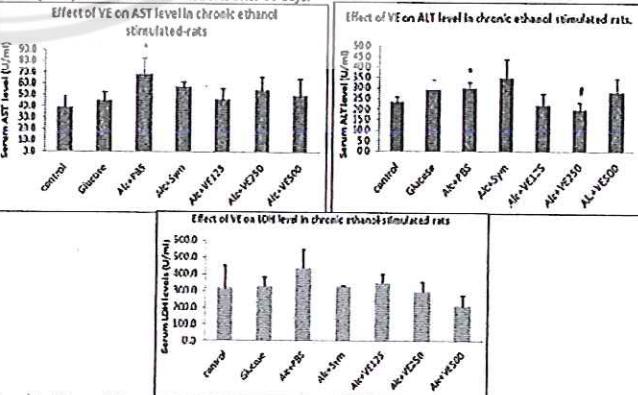


Figure 2. Effects of *Vernonia cinerea* (VE) extracts on AST, ALT and LDH level (U/ml) in chronic ethanol-stimulated rats.

### Conclusion

Long term exposure to alcohol induced liver damages in rats by demonstrating the increase of the liver function enzyme levels and VE water extracts could reduce the production of ALT enzyme. Therefore, the VE extracts might be beneficial on ALD.

### Acknowledgement

Financial support from the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC).