รหัสโครงการ SUT3-305-62-12-30

รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยใบมะยมสกัดด้วยน้ำในหนูที่ถูกป้อนแอลกอฮอล์

Gastroprotective Effect of Hot Water Extracts of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels Leaf Extract Against Alcohol-Induced Gastric Ulcer Model Rats

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-305-62-12-30

รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยใบมะยมสกัดด้วยน้ำในหนูที่ถูกป้อนแอลกอฮอล์

Gastroprotective Effect of Hot Water Extracts of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels Leaf Extract Against Alcohol-Induced Gastric Ulcer Model Rats

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อ.ดร.กิติพงษ์ พรมโย
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2562
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2565

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีประจำปีงบประมาณ พ.ศ 2562 ซึ่งงานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก ผศ. ดร.รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ และ รศ. ดร.สุทิศา เข็มผะกา ที่ช่วยสนับสนุนสารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ และ เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ 3 และเจ้าหน้าที่ประจำอาคารสัตว์ทดลองที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัย
มกราคม 2565

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

โรคแผลในกระเพาะอาหารเป็นหนึ่งในโรคระบบทางเดินอาหารที่พบมากที่สุดซึ่งการใช้ยาในการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารนั้นส่วนใหญ่มักจะทำให้เกิดผลข้างเคียงอื่นๆตามมา เช่น อาการปวดหัว ท้องร่วงและท้องผูกเป็นต้น ทำให้การใช้ยาที่สกัดมาจากพืชในการรักษาและหรือควบคุมอาการของผู้ป่วยเป็นการลำดับแรกกำลังเป็นที่ได้รับความนิยมเนื่องจากมีความปลอดภัยและราคาถูก ใบมะยม *Phyllanthus acidus (L.)* Skeels (PE) leaf ถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณกันอย่างแพร่หลายในทวีปเอเชียเช่น ควบคุมความดันโลหิต การบรรเทาไข้ และ อาการปวดหัว เนื่องจากใบมะยมนั้นมีองค์ประกอบของพฤกษเคมีต่างๆ อาทิเช่นสารฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิค เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาปริมาณ total phenolic และ total flavonoid และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและ การป้องกันโรคแผลในกระเพาะอาหารของสารสกัดใบมะยม โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิค และ ฟลาโวนอยด์ ใช้วิธี Folin–Ciocalteu และ aluminum chloride colorimetry ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะยมใช้วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) และ Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP) ในส่วนการศึกษาฤทธิ์การป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของสารสกัดใบมะยมนั้นได้ทำการทดสอบในหนูทดลองโดยหนูทดลองเพศผู้สายพันธุ์ Wistra ถูกป้อนด้วยสารสกัดใบมะยมในปริมาณ 250 หรือ 500 mg/kg และ omeprazole 40 mg/kg เป็นระยะเวลา 14 วัน ซึ่งในวันที่ 14 หนูถูกป้อนด้วยสารสกัดใบมะยมก่อน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระพาะอาหารด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (5 ml/kg) เมื่องระยะเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมงหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร หนูทดลองถูกการุณยฆาตและตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะอาหารและชิ้นส่วนกระเพาะอาหารถูกเก็บเพื่อนำไปวิเคราะห์ Ulcer index (UI), pH, total acidity, oxidative stress และการอักเสบ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงจุลพยาธิวิทยา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบมะยมมีปริมาณ total phenolic เท่ากับ 102.91 ± 0.09 (mg GAE /g extract powder) และ total flavonoid เท่ากับ 339.60 ± 0.70 (mg QE /g extract powder) นอกจากนี้สารกัดใบมะยมมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH ที่ระดับ % inhibition 9.76 ± 0.92 (mg ascorbic acid/g extract powder) และ FRAP assay ที่ระดับ 36.69 ± 0.32 (mmol FeSO4/g extract powder) หนูทดลองที่ได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 250 และ 500 mg/kg bodyweight แสดงการลดลงของการลดลงของค่า ulcer index และ pH และ การเพิ่มขึ้นของค่า total acidity และ % ulcer inhibition นอกจากนี้สารสกัดจากใบมะยมช่วยลดปริมาณ malondialdehyde และ การแสดงออกระดับโปรตีน Nf-kB p65 ในตัวอย่างกระเพาะอาหาร จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดใบมะยามสามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร, oxidative stress และการอักเสบได้

Abstract

Gastric ulcer (GU) is the most common gastrointestinal diseases. The most commonly drug used to treat GI has side effects such as headaches diarrhoea or constipation. Therefore, plant- derived medicine become popular to use as the first line therapy for gastric ulcer due to safe and cost benefit. *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels (PE) leaf is widely used as traditional medicine in Asia to control blood pressure and relieve fever and headache because it contains various phytochemistry such as flavonois and phenolic compound. The aim of this study is to examine total phenolic contents, flavonoid contents, antioxidant activities, and gastroprotective effect of PE water leaf extract. The total phenolic and flavonoid contents were analyzed by Folin–Ciocalteu and Aluminum chloride colorimetry method and antioxidant activities of PE leaf water extract were performed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP) assays. For gastroprotective effects of PE water leaf extract were performed in animal model. The male Wistar rats (180-120 g) were divided into 3 groups. Each group was fed with extracts of the PE leaf water extract at dose 250 and 500 mg/kg and omeprazole 40 mg/kg for 14 days. On day 14 the rats were fed with PE leaf water extract at 1 hour prior to ulcer induction by absolute ethanol (5 ml/kg). After 1 hour of ulcer induction, the rats were scarified and the gastric juice and stomachs sample were collected to measure gastric Ulcer index (UI), pH, total acidity, oxidative stress and inflammation parameters, including histopathological changes. The results showed that the total phenolic and flavonoid contents of PE leaf were at 102.91 ± 0.09 (mg GAE /g extract powder) and 339.60 ± 0.70 (mg QE /g extract powder) respectively. Moreover, the PE leaf water extract showed antioxidant activities by DPPH at % inhibition 9.76 ± 0.92 mg ascorbic acid/g extract powder and by FRAP at 36.69 ± 0.32 mmol $FeSO_4$/g extract powder respectively. The rats fed with PE leaf water extract at 250 and 500 mg/kg reduced ulcer index and pH and increased total acidity and % ulcer inhibition. Moreover, PE leaf water extract reduced malondialdehyde level and expression of NF-kB p65 protein in stomach tissue. According to the results, suggested that PE leaf water extract had gastroprotective activity and anti-oxidative stress and inflammation.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อ ..... ข
Abstract ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญรูปภาพ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย 2
1.3 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 6
3.1 การเตรียมตัวอย่างใบมะยม 6
3.2 การสกัดใบมะยม 6
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด 6
3.4 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay 6
3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power 7
3.6 การวิเคราะหปริมาณสารฟลาโวนอยด 7
3.7 สัตว์ทดลอง 7
3.7.1 การทดลองที่ 1 : การทดลองในเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณของสารสกัดใบมะยมที่พอเหมาะต่อการลดการเกิดแผลกระเพาะอาหารในหนู (Preliminary experiment) 7
3.7.2 การทดลองที่ 2 : การศึกษาผลของการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยสารสกัดใบมะยมในหนูที่ถูกป้อนแอลกอฮอล์ 8
3.8 การวัดปริมาณของเหลวในกระเพาะและ pH 8
3.9 การวิเคราะห์ free and total acidity 8
3.10 การวิเคราะห์ดัชนีการเกิดแผล (Ulcer Index) 9

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.11 การวิเคราะห์ Lipid oxidation 9
3.12 การวิเคราะห์การแสดงออกในระดับโปรตีน ด้วยวิธี Western blot 9
3.13 การทดสอบทางพยาธิสภาพ 9
3.14 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 10
บทที่ 4 ผลการวิจัย 11
4.1 ปริมาณสารประกอบฟินอลิกและฟลาโวนอยด์และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะยม 11
4.2 การทดลองที่ 1 : การทดลองในเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณของสารสกัดใบมะยมที่พอเหมาะต่อการลดการเกิดแผลกระเพาะอาหารในหนู (Preliminary experiment) 12
4.3 การทดลองที่ 2: การศึกษาผลของการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยสารสกัดใบมะยมในหนูที่ถูกป้อนแอลกอฮอล์ 15
4.3.1 ดัชนีการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและค่าร้อยละการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูทดลอง 15
4.3.2 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการเกิด Lipid oxidation ในกระเพาะอาหาร 18
4.3.3 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการแสดงออกในระดับโปรตีน NF-kB p65 19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 20
5.1 อภิปรายผลการทดลอง 20
5.2 สรุปผลการวิจัย 22
5.3 ข้อเสนอแนะ 22
บรรณานุกรม 23
ประวัตินักวิจัย 29

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย absolute alcohol..... 12

รูปที่ 2 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการลดค่า Ulcer Index หรือค่าร้อยละดัชนีแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol.....13

รูปที่ 3 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อค่า % Ulcer Inhibition หรือค่าเปอร์เซนต์ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol 14

รูปที่ 4 แสดงการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย absolute alcohol..... 15

รูปที่ 5 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในเซลล์กระเพาะอาหารหนูทดลอง 16

รูปที่ 6 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการลดค่า Ulcer Index หรือค่าร้อยละดัชนีแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol 17

รูปที่ 7 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อ lipid oxidation ในตัวอย่างกระเพาะอาหารของหนูทดลอง 19

รูปที่ 8 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการแสดงออกระดับโปรตีน NF-kB p65 ในตัวอย่างกระเพาะอาหารของหนูทดลอง..... 19

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟินอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบมะยม 11

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อค่า % ulcer inhibition และ total acidity, pH และปริมาณของเหลวในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol 18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคแผลในกระเพาะอาหาร (gastric ulcer; GU) จัดเป็นโรค หรือสาเหตุที่พบได้บ่อยในผู้ที่มีอาการปวดท้องบริเวณกระเพาะอาหาร แบบชนิด organic dyspepsia จากข้อมูลการสำรวจพบว่าทุกๆ 100 ราย ของผู้ที่ปวดท้องกระเพาะอาหาร (หรือที่นิยมเรียกกันว่า “ปวดท้อง dyspepsia”) นั้นจะตรวจพบแผลในกระเพาะอาหารได้ตั้งแต่ 5-15 ราย โดยความชุกของโรคนี้จะมีมากขึ้นในประเทศกำลังพัฒนา สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นแผลในกระเพาะอาหาร (GU) นั้นมีอยู่ด้วยกันหลายสาเหตุ แต่ที่มีความสำคัญมากมี 2 ประการ คือ เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร (*Helicobacter pylori)* ในกระเพาะอาหาร ซึ่งพบได้บ่อยในประชากรไทย โดยได้รับเชื้อผ่านทาง อาหารและน้ำดื่มที่ไม่สะอาด หรือจากการสัมผัสสารคัดหลั่งของผู้ที่มีเชื้อนี้อยู่ก่อน เช่น น้ำลาย น้ำย่อยหรือคราบอาเจียร เชื้อ *Helicobacter pylori* จะทำให้ผิวกระเพาะอาหารเกิดการอักเสบเรื้อรังจนเกิดเป็นแผล และ ในบางรายอาจรุนแรงถึงขั้นกลายพันธุ์ต่อไปจนเกิดเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารชนิด gastric adenocarcinoma หรือมะเร็งต่อมน้ำเหลืองในกระเพาะอาหาร (gastric lymphoma) ตามมาได้ ส่วนสาเหตุที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการเกิดแผล GU คือ มีการใช้ยาแก้ปวดแก้อักเสบ ในกลุ่ม non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ในขนาดสูง หรือใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน (ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์กัดกร่อน ผิวกระเพาะอาหาร) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยหรือสาเหตุอื่น ๆ อีกหลาย ประการที่สามารถทำให้เกิดแผล GU ขึ้นได้เช่น การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ หรือการรับประทานอาหารที่มีรสเผ็ด

การรักษาแผลในกระเพาะอาหารสามารถทำได้โดยให้ยาลดกรดหรือยารักษาแผลในกระเพาะอาหารติดต่อกันอย่างน้อย 6-8 สัปดาห์ รวมทั้งให้ยากำจัดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร (ในกรณีที่มีการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร ร่วมด้วย) เช่น โอเมพราโซล (Omeprazole) แลนโซพราโซล (Lansoprazole) ราบีพราโซล (Rabeprazole) อีโซเมปราโซล (Esomeprazole) แพนโทพราโซล (Pantoprazole) เป็นต้น เพื่อยับยั้งการสร้างกรดและรักษาแผลในกระเพาะอาหาร หากใช้ยาในปริมาณมากและเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาได้ เช่น วิงเวียน ปวดศีรษะ ท้องเสียหรือท้องผูก ปวดท้อง รวมถึงเพิ่มความเสี่ยงต่อกระดูกสันหลัง กระดูกข้อมือ หรือกระดูกสะโพกหักได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไรได้ ดังนั้นการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารแนวใหม่ด้วยสารสกัดจากพืชจึงเป็นที่นิยมมากขึ้นเนื่องจากปลอดภัย มาจากธรรมชาติและ ราคาไม่แพง ต้นมะยม จัดเป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกากลางพบได้ทั่วไปในเขตร้อนทุกทวีป โดยเฉพาะในประเทศไทย มะยม (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) เป็นไม้ยืนต้นพื้นบ้าน มีทั้งชนิดเปรี้ยวและชนิดหวาน ในประเทศไทยมะยมถือเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้าน เพราะทุกส่วนของต้นมะยมสามารถนำมาทำเป็นยาเพื่อบรรเทาอาการเจ็บป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใบมะยมที่ได้มีการนำมาใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการโรคต่างๆเช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน ต้านการอักเสบ และแก้ปวด นอกจากนี้แล้วใบมะยมยังอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระต่างเช่น kaempferol, hypogallic acid,

gallic acid, quercetin, alkaloid, tannin, flavonoid, phenolic จากข้อมูลดังกล่าวใบมะยมจึงน่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแผลในกระเพาะได้ ดังนั้นโครงร่างงานวิจัยนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยั้บยั้งการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยแอลกอฮอล์ของสารสกัดใบมะยม

1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1) ศึกษาปริมาณสารฟินอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะยม
2) ศึกษาฤทธิ์ของใบมะยมในการบรรเทาการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกป้อนด้วยแอลกอฮอล์

1.3 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย

ใบมะยมอุดมไปด้วยสารพฤษเคมี (phytochemical) ต่างๆเช่น kaempferol, hypogallic acid, gallic acid, quercetin, alkaloid, tannin, flavonoid, phenolic ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการอักเสบ นอกจากนี้ใบมะยมยังมีคุณสมบัติช่วยในการห้ามเลือด ดังนั้นใบมะยมน่าจะมีประสิทธิภาพในการบรรเทาการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1) ได้องค์ความรู้และข้อมูลทางวิชาการของใบมะยมต่อการใช้บรรเทาการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร
2) เกษตรกร ผู้ประกอบการ และนักวิจัยสามารถนำข้อมูลนี้ไปต่อยอดในเชิงธุรกิจหรือเชิงวิชาการได้
3) ข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปเผยแพร่ลงในวารสารวิชาการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคแผลในกระเพาะอาหารหรือ peptic ulcer ถือเป็นหนึ่งในโรคการย่อยอาหารที่พบมากที่สุดในศตวรรตนี้ (De Lira Mota และคณะ, 2009) โดยแผลมักจะเกิดขึ้นในบริเวณใดบริเวณหนึ่งของทางเดินอาหารโดยเฉพาะบริเวณเยื่อบุของกระเพาะ ผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหารสามารถมีอาการหรืออาการแสดงที่ผิดปกติได้หลายอย่าง (ส่วนมากมักมีอาการปวดท้องชนิดเป็นๆหายๆ ในตำแหน่งช่องท้องส่วนบน เช่น บริเวณเหนือสะดือ ลิ้นปี่ หรือยอดอก โดยมักปวดในลักษณะแสบร้อน ท้อง จุกเสียด แน่นท้อง รู้สึกท้องเกร็งแข็ง หรือรู้สึกปวดบีบมวนท้อง คล้ายอยากถ่ายอุจจาระ โดยอาการเหล่านี้มักเป็นในช่วงท้องว่าง ก่อนมื้ออาหาร ตอนกลางคืน ขณะนอนหลับหรือภายหลังรับประทานยา โดยเฉพาะยาที่มีฤทธิ์ระคายเคืองต่อผิวกระเพาะอาหาร (เช่น ยาแอสไพริน ยากลุ่ม NSAIDs เป็นต้น) สาเหตุของการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหารนั้นมาจากความไม่สมดุลระหว่างปัจจัยเร่งการทำลายเยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (aggressive factors) เช่น การหลั่งกรดไฮโดรคลอริก (HCl), น้ำย่อยเพปซิน (pepsin) หรือสาร oxidative stress (oxygen free radicals) และ ปัจจัยที่ช่วยปกป้องและซ่อมแซมเยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (defects in protective and mucosal repair factors) เช่น กระเพาะอาหารขาดสาร endogenous prostaglandins (โดยเฉพาะ PGE2), มีภาวะที่ทำให้ผิวกระเพาะอาหารสร้างเยื่อเมือก (gastric mucus) ลดลง, มีการลดลงของสาร bicarbonate (HCO_3) และ nitric oxide (NO), ผิวกระเพาะอาหารขาดเลือดมาเลี้ยง (decreasing mucosal blood flow) ทำให้เกิดความบกพร่องในการสร้างเยื่อบุผิว (epithelial proliferation defect) (Goel และคณะ 1991, Schubert 2004) ปัจจัยที่สำคัญที่กระตุ้นให้เกิดโรคแผลในกระเพาะอาหารได้แก่ ติดเชื้อ แบคทีเรีย H. pylori, ใช้ยาแอสไพรินหรือยาในกลุ่ม nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Vonkeman และคณะ 2007) นอกจากนี้ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหารก็คือการดื่มแอลกอฮอล์ในปริมาณสูง ซึ่งจะทำให้หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และ และลำไส้ได้รับความเสียหายการดูดซึมของลำไส้เกิดความผิดปกติ จึงทำให้มีงานวิจัยหลายชิ้นที่ศึกษาโรคแผลในกระเพาะอาหารมักจะใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารของสัตว์ทดลอง (Cadirci และคณะ 2007, Alimi และคณะ 2011) ถึงแม้ว่ากระบวนการการทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารอันเนื่องมาจากแอลกอฮอล์ยังไม่เป็นที่ชัดเจน แต่ก็ได้มีงานวิจัยที่ตั้งสมมติฐานไว้ว่าแอลกอฮอล์น่าจะไปรบกวน ทำลายและทำให้เซลในส่วนของผนังกั้นเยื่อเมือกของกระเพาะ (gastric mucosal barrier) หลุดออกมา ทำให้กรดสัมผัสกับผิวของ mucosa โดยตรง ทำให้mucosaถูกทำลายส่งผลให้เกิดการไหลของเลือด และแอลกอฮอล์ยังเป็นปัจจัยเสริมที่ทำให้ผิวกระเพาะอาหารเกิดการอักเสบ และoxidative stress (Guslandi 1987, Melchiorri และคณะ 1997, Pan และคณะ 2008, Arda-Pirincci และคณะ 2006)

ในปัจจุบันได้มีตัวยาหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารได้แก่ ยาปฏิชีวนะ เช่น อะม็อกซีซิลลิน (Amoxicillin) คลาริโธรมัยซิน (Clarithromycin) เมโทรนิดาโซล (Metronidazole) ทินิดาโซล (Tinidazole) เตตราไซคลีน (Tetracycline) ลีโวฟลอกซาซิน (Levofloxacin), ยาProton pump inhibitors (PPIs) เช่น โอเมพราโซล (Omeprazole) แลนโซพรา

โซล (Lansoprazole) ราบีพราโซล (Rabeprazole) อีโซเมปราโซล (Esomeprazole) แพนโทพราโซล (Pantoprazole) และ ยา H2-Receptor Antagonists เช่น แรนิทิดีน (Ranitidine) ฟาโมทิดีน (Famotidine) ไซเมทิดีน (Cimetidine) เพื่อยับยั้งการสร้างกรดและรักษาแผลในกระเพาะอาหาร, และตัวยาที่มีฤทธิ์เคลือบกระเพาะอาหาร เช่น ซูคราลเฟต (Sucralfate) ไมโซพรอสทอล (Misoprostol) เพื่อปกป้องเยื่อบุในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจากการทำลายของกรด (Kuna และคณะ 2019) อย่างไรก็ตามการใช้ยาเหล่านี้เป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงตามมา เช่น วิงเวียน ปวดศีรษะ ท้องเสียหรือท้องผูก ปวดท้อง ลดการดูดซึมแร่ธาตุ สารอาหารเข้าสู่ร่างกาย ทำให้ร่างกายมีความเสี่ยงต่อการขาดสารอาหาร รวมถึงเพิ่มความเสี่ยงต่อกระดูกสันหลัง กระดูกข้อมือ หรือกระดูกสะโพกหัก นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไรได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้นักวิจัยหันมาให้ความสนใจที่จะศึกษาค้นคว้าเพื่อผลิตยารักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารที่มาจากธรรมชาติอัน
เนื่องมาจาก มีราคาถูก หาง่าย และมีความปลอดภัย ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยหลายงานที่ทำการศึกษาการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อนำมาใช้บรรเทาอาการหรือรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร เช่น Balogun และคณะ (2018) ได้พบว่าสารสกัดจากถั่ว (*Vigna Subterranea*) สามารถลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกป้อนแอลกอฮอล์ด้วยการ ลดการหลั่งของกรดและเพิ่มการสร้างเมือกเคลือบผิวกระเพาะอาหาร Guzmán-Gómez และคณะ (2018) ได้รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Arthrospira (Spirulina) maxima*) สามารถลดการอักเสบ oxidative stress และแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกป้อนด้วยแอลกอฮอล์อันเนื่องมาจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้นมี
คุณสมบัติเป็น anti-oxidant และ anti-inflammation นอกจากนี้ Mabrok และ Mohamed (2019) ได้ค้นพบว่าสารสกัดจากใบมะรุม (*Moringa oleifera*) สามารถ ช่วยบรรเทาการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกป้อนด้วยแอสไพริน โดยการลดปริมาณกรด ลดการอักเสบ และยังช่วยเพิ่มปริมาณ ไนตริกออกไซด์ และกระตุ้นการทำงานของ cyclooxygenase ซึ่งมีส่วนสำคัญในการผลิตสาร prostaglandin ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการหลั่งของกรด กระตุ้นการหลั่งสารไบคาร์บอเนตและการไหลเวียนของเลือดภายในกระเพาะอาหารทำให้ช่วยต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร สารสกัดจากธรรมชาติเหล่านี้สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ และ สารประกอบฟีนอล ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และถูกรายงานว่ามีความสามารถในการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ดังนั้นการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการยับยั้งหรือรักษาการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหารน่าจะเป็นการรักษาแนวใหม่ที่จะถูกนำมาใช้ทดแทนการใช้ยาที่มาจากการสังเคราะห์ในอนาคต

มะยม (*Phyllanthus acidus* (L.) *Skeels*) เป็นพืชยืนต้นขนาดเล็กถึงกลาง พบได้มากในแถบทวีปเอเชีย ดอกของมะยมมีสีแดง ผลของมะยมมีรสเปรี้ยวสามารถรับประทานได้ ใบมะยมมีสีเขียวลักษณะบาง และยาว 2-7.5 เซนติเมตร ด้านบนของใบมีผิวเรียบ ในประเทศไทยใบของมะยมถูกนำมาบริโภคหรือใช้ปืนยาแผนโบราณในการรักษาหรือบรรเทาอาการของโรคต่างๆเช่น ไข้หวัด, ริดสีดวงทวาร , ไข้ทรพิษ, อาการคัน, เหงือกอักเสบ, โรคความดันสูง, ตับเป็นพิษ, การอักเสบา, และโรคเบาหวาน ใบของมะยมอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆเช่น kaempferol, hypogallic acid, gallic acid, quercetin, alkaloid, tannin, flavonoid, phenolic, และ terpene (Jagajothi และคณะ 2014) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบ Fatriyawan และคณะ (2016) พบว่า สารสกัดใบมะยมด้วยแอลกอฮอล์สามารถลดภาวะ hypercholesterolemia และ การเกิดออกซิเดชั่นของไขมันในหนูที่กินอาหารไขมันสูง Chongsa และคณะ (2015) ค้นพบว่าหนูเพศผู้อายุวัยกลางคนเมื่อได้รับสารสกัดจากใบมะยมเป็นเวลา 6 สัปดาห์สามารถช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบหลอดเลือดให้ดีขึ้น

Chainum-aom และคณะ (2016) ได้รายงานว่า สารสกัดจากใบมะยมมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานด้วยการฉีดสาร streptozotocin นอกจากนี้สารสกัดจากใบมะยมยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการการเกิด oxidative stress และความเป็นพิษต่อตับในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย acetaminophen (paracetamol, APAP) (Jain และ Singhai 2011) จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้เห็นว่าใบมะยมน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหารและจนกระทั่งตอนนี้ยังไม่มีใครได้ศึกษาผลของสารสกัดของใบมะยมต่อการยับยั้งโรคนี้ ดังนั้นการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดจากใบมะยมในการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร จะเป็นการสร้างองค์ความรู้ ข้อมูลทางวิชาการ ทางการแพทย์ และสามารถเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้ให้กับบุคคลทั่วไป ผู้ประกอบการหรือนักวิจัย เพื่อนำข้อมูลงานวิจัยไปต่อยอดใช้ประโยชน์ต่อไปได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างใบมะยม

วิธีการเตรียมตัวอย่างใบมะยมดัดแปลงมาจาก Shang และคณะ (2017) นำใบมะยมาล้างทำความสะอาดจากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C จนส่วนของพืชที่นำมาอบนั้นแห้งอย่างทั่วถึง แล้วนำมาปั่นเป็นชิ้นเล็กๆด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า

3.2 การสกัดใบมะยม

นำใบมะยมแห้งมาสกัดด้วยน้ำเดือด ในอัตราส่วนใบมะยมหรือใบมะยมแห้ง 1 ส่วนต่อสารสกัด 10 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 นำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) นำสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นำสารที่ได้เข้าเครื่อง Freeze dry จะได้สารสกัดใบมะยม (Liaotrakoon และคณะ 2021)

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด

นำสารสกัดมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kumar และคณะ (2014) โดยเติมสารสกัดลงในหลอดทดลองที่มี Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 0.2 N หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2Co_3) ความเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่าที่วัดได้จากน้ำกลั่นและสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ มาทำเป็นกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้เปรียบเทียบกับค่าที่วัด ได้ของสารสกัดหยาบ และคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบในรูปของ milligram Gallic Acid Equivalent (mg GAE)/g extract powder

3.4 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay

การทดสอบนำสารสกัดตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างกันใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.6 mM เขย่าให้เข้ากัน เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นcontrol นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและความเข้มข้น จากสูตร % inhibition = $[(A_{control} - A_{sample})/ A_{control} \times 100]$ เมื่อกำหนดให้ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มควบคุม และ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มตัวอย่างของ สารที่นำมาศึกษา โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid แสดงค่าในรูปของ mg ascorbic acid/g extract powder (Nariya และคณะ 2013)

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power

ดัดแปลงตามวิธีของ Benzie และ Strain (1996) สาร FRAP ถูกเตรียมจากการผสมกันระหว่าง acetate buffer (300 mM, pH 3.6), สารละลาย TPTZ ที่ละลายใน 40 mM HCl, และ 20 mM $FeCl_3$ ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v/v) ในขั้นตอนการวิเคราะห์ สาร FRAP 3.4 ml ถูกนำมาผสมกับสารสกัดใบมะยม 0.1 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 593 nm แล้วรายงานค่าที่ได้ในรูป mmol $FeSO_4$/g extract powder

3.6 การวิเคราะหปริมาณสารฟลาโวนอยด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยดโดยวิธี aluminum chloride colorimetry (Chang และคณะ 2002) โดยใชเคอรซิตินเปนสารมาตรฐาน (ความเขมขน 12.5-100 mg/ml) ละลายสารสกัดดวยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1mg/ml ดูดสารสกัด 0.5 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง แลวเติมเอทานอล 95 % ลงไป 1.5 ml จากนั้นเติม 10 % aluminium chloride 0.1 ml เขยาใหเขากันแลวนำไปเติม 1 M potassium acetate ปริมาตร 0.1 ml แลวปรับปริมาตรดวยน้ำกลั่นจนครบ 5 ml ตั้งทิ้งไวที่อุณหภูมิหอง เปนเวลา 30 นาทีนำสารละลายที่ไดไปวัดคาการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยดในสารสกัดโดย เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอรซิติน ในหนวย mg of quercetin equivalent / g extract powder

3.7 สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar น้ำหนักประมาณ 180-200 g ถูกเลี้ยงในกรงสัตว์ทดลองที่ได้มาตรฐาน ให้อาหารและน้ำตามปกติ ปรับ อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส แสงมืด-สว่าง สลับทุกๆ 12 ชั่วโมง ให้หนูปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ 7 วัน ก่อนการทดลอง

การทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 2 การทดลองโดยการทดลองที่ 1 จะเป็นการทดลองเบื้องต้น หรือ Preliminary experiment ใช้จำนวนสัตว์ทดลองไม่มาก เพื่อหาปริมาณของตัวอย่างที่มีแนวโน้มในการลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ส่วนในการทดลองที่สองจะเป็น Critical experiment หรือการทดลองจริงที่มีการใช้จำนวนสัตว์ทดลองที่มากพอสำหรับตรวจวัดความแตกต่าง

3.7.1 การทดลองที่ 1 : การทดลองในเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณของสารสกัดใบมะยมที่พอเหมาะต่อการลดการเกิดแผลกระเพาะอาหารในหนู (Preliminary experiment)

หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาในการพักเลี้ยง ได้มีการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว โดย :

กลุ่ม Control : หนูจะได้รับน้ำกลั่นทางปาก
กลุ่ม Alcohol : หนูจะได้รับน้ำกลั่นทางปาก
กลุ่ม PE100 : หนูจะได้รับสารสกัดใบมะยม 100 mg/kg bodyweight ทางปาก
กลุ่ม PE300 : หนูจะได้รับสารสกัดใบมะยม 300 mg/kg bodyweight ทางปาก
กลุ่ม PE500 : หนูจะได้รับสารสกัดใบมะยม 500 mg/kg bodyweight ทางปาก
กลุ่ม PE1000 : หนูจะได้รับสารสกัดใบมะยม 1,000 mg/kg bodyweight ทางปาก
กลุ่ม OM : หนูจะได้รับยาลดกรด omeprazole 40 mg/kg bodyweight ทางปาก

หนูทุกกลุ่มจะได้รับสารสกัดหรือน้ำทุกวันวันละ1ครั้งเป็นเวลา 14 วัน ในวันที่ 14 หนู จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ โดยหนูในกลุ่มที่ 2-6 จะได้รับแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 5 ml/kg bodyweight ทางปาก หลังจากป้อนแอลกอฮอล์ 1 ชั่วโมงหนูจะถูกทำให้ตายด้วยการวางยาสลบด้วย carbon dioxide ในปริมาณที่มากเกินพอ หลังจากนั้นกระเพาะอาหารของหนูจะถูกนำมาออกมา วัดดัชนีการเกิดแผล (Degree of ulceration)

ปริมาณของสารสกัดใบมะยม 2 ขนาดที่สามารถลดดัชนีการเกิดแผลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ 2 จะถูกเลือกนำมาใช้ในการทดลองถัดไป

3.7.2 การทดลองที่ 2 : การศึกษาผลของการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยสารสกัดใบมะยมในหนูที่ถูกป้อนแอลกอฮอล์

หนูล๊อตใหม่จะถูกนำมาปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่หลังจะถูกนำมาแบ่งกลุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มล่ะ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่ม Control : หนูจะได้รับน้ำกลั่นทางปาก
กลุ่ม Alcohol : หนูจะได้รับน้ำกลั่นทางปาก
กลุ่ม PE250 : หนูจะได้รับสารสกัดใบมะยม 250 mg/kg bodyweight ทางปาก
กลุ่ม PE500 : หนูจะได้รับสารสกัดใบมะยม 500 mg/kg bodyweight ทางปาก
กลุ่ม OM : หนูจะได้รับยาลดกรด omeprazole 40 mg/kg bodyweight ทางปาก

หนูทุกกลุ่มจะได้รับสารสกัดหรือน้ำทุกวันวันละ1ครั้งเป็นเวลา 14 วัน ในวันที่ 14 หนูจะได้รับสารตัวอย่างเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ โดยหนูในกลุ่มที่ 2-5 จะได้รับแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 5 ml/kg bodyweight ทางปาก หลังจากป้อนแอลกอฮอล์ 1 ชั่วโมงหนูจะถูกทำให้ตายด้วยการวางยาสลบด้วย carbon dioxide ในปริมาณที่มากเกินพอ หลังจากนั้นกระเพาะอาหารของหนูจะถูกนำมาออกมา ของเหลวที่อยู่ในกระเพาะอาหารจะถูกเก็บนำมาวัดปริมาตร หลังจากนั้นจะถูกนำไปวัด pH และวัดปริมาณ free และ total acidity กระเพาะอาหารจะถูกนำมาวัดดัชนีการเกิดแผล หลังจากนั้นกระเพาะอาหารจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะถูกนำไปแช่แข็งที่ -80°C เพื่อทำการวิเคราะห์ lipid oxidation และ inflammation ส่วนที่สองจะถูกนำไปแช่ใน ฟอมาลีนความเข้มข้น 10% เพื่อนำไปศึกษาจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

3.8 การวัดปริมาณของเหลวในกระเพาะและ pH

ของเหลวที่เก็บมาจากกระเพาะอาหารจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นของเหลวจะถูกนำไปวัดปริมาตรด้วย syringe ส่วน pH ของของเหลวในกระเพาะจะถูกนำไปวัดด้วยเครื่อง pH มิเตอร์

3.9 การวิเคราะห์ total acidity

ของเหลวในกระเพาะอาหารจะถูกนำมาไทเทรตกับ 0.01 N NaOH โดยใช้ phenolphthalein (สำหรับ total acidity) เป็นอินดิเคเตอร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.10 การวิเคราะห์ดัชนีการเกิดแผล (Ulcer Index)

การวิเคราะห์ดัชนีการเกิดแผลจะทำตามวิธีของ (de Araújo และ คณะ, 2018) โดยกระเพาะอาหารของหนูจะถูกเปิดออกจากด้านของ greater curvature หลังจากนั้นทำความสะอาดกระเพาะอาหารด้วยน้ำเกลือ (0.9%) เพื่อกำจัดลิ่มเลือด พื้นที่ของแผลในกระเพาะอาหาร (mm^2) จะถูกวัดด้วยโปรแกรม Image J ค่า Ulcer Index (UI) ของหนูแต่ละตัวจะถูกคำนวนตามสูตร:

UI = (TAML (mm^2) × 100)/(TMA (mm^2))

โดยที่ TMA คือพื้นที่ทั้งหมดของผิว Mucosa ส่วน TAML คือพื้นที่ผิวของแผลทั้งหมดที่เกิดขึ้นบน mucosa

นอกจากนี้ % Ulcer inhibition จะถูกคำนวนตามสูตร:

% Ulcer inhibition = (UI control – UI treated)/(UI control) × 100

โดยที่ UI control คือ UI ของหนูในกลุ่มที่ 2 ส่วน UI treated คือค่า UI ของหนูในกลุ่มที่ 3-6

3.11 การวิเคราะห์ Lipid oxidation

ตัวอย่างกระเพาะอาหารจะถูกนำมาสกัดด้วย สาระลาย 100 mM Tris buffer (pH 7.4) จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C นำส่วนของ supernatant มาผสมกับ 10% Trichloroacetic acid และ 0.6% Thiobarbituric acid ในหลอดทดลอง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5000×g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำส่วนของ supernatant ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ในกระเพาะอาหารคำนวณได้จาก standard curve ของ MDA (Promyo และคณะ 2017)

3.12 การวิเคราะห์การแสดงออกในระดับโปรตีน ด้วยวิธี Western blot

ดัดแปลงจากวิธีของ Promyo และคณะ (2017) ตัวอย่างกระเพาะอาหารจะถูกนำมา homogenize ใน RIPA buffer(50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and 1% protease inhibitor) จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 15,000×g เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนของ supernatant มาวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford method หลังจากนั้นนำsupernatantไปแยกหาแถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis หลังจากนั้น Transfer แถบโปรตีนลงบน PVDF membrane แล้วนำไป incubate กับ primary antibody (anti-NF-kB p65 antibody) ที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน (12 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำมา incubate กับ HRP-conjugated secondary antibody นาน 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยากับ ECL plus reagent แล้วนำแผ่นmembraneไปตรวจสอบหาการเรืองแสงของแถบโปรตีนที่เฉพาะเจาะจงด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (GE Healthcare/image Qaunt LAS500)

3.13 การทดสอบทางพยาธิสภาพ

กระเพาะอาหารจะถูกล้างด้วย saline buffer เก็บรักษาไว้ใน 4 % formaldehyde fixative กำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วยแอลกอฮอล์ ทำ paraffin blocks ตัดชิ้นเนื้อด้วย microtome ขนาดความหนา 4 ไมครอน ย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin (H & E) ประเมินความเปลี่ยนแปลงพยาธิ

วิทยาสภาพ ของกระเพาะอาหารด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยตรวจลักษณะความผิดปกติต่าง ๆ (Li และคณะ 2013)

3.14 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลของผลการทดลองที่ 1 แสดงค่า Mean ± SEM และ ผลการทดลองที่ 2 แสดงค่า Mean ± SD ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทั้งในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียว (one way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วย Tukey's post hoc test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ปริมาณสารประกอบฟินอลิกและฟลาโวนอยด์และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะยม

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบมะยมด้วยวิธี DPPH, FRAP, total phenolic contents, และ total flavonoid content แสดงในตารางที่ 1 พบว่า ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของสารสกัดใบมะยมด้วยวิธี DPPH และ FRAP พบว่ามีค่าเท่ากับ 9.76 ± 0.92 (mg ascorbic acid/g extract powder) และ 36.69 ± 0.32 (mmol $FeSO_4$/g extract powder) ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดใบมะยม มีค่าเท่ากับ 102.91 ± 0.09 (mg GAE /g extract powder) และ 339.60 ± 0.70 (mg QE /g extract powder) ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบมะยม มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ(ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟินอลิคและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบมะยม

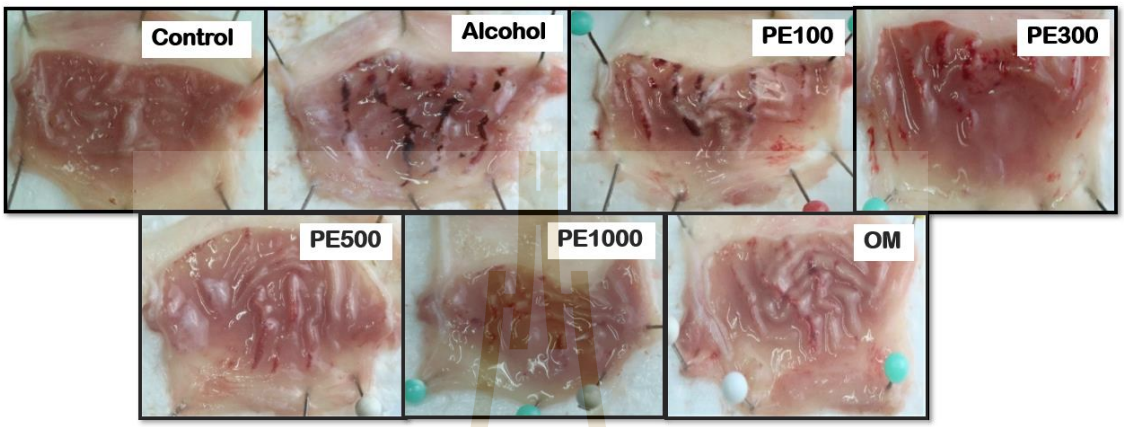
การวิเคราะห์	ผลการทดลอง
DPPH	9.76 ± 0.92 (mg ascorbic acid/g extract powder)
FRAP	36.69 ± 0.32 (mmol $FeSO_4$/g extract powder)
Total phenolic contents	102.91 ± 0.09 (mg GAE /g extract powder)
Total flavonoid content	339.60 ± 0.70 (mg QE /g extract powder)

GAE= Gallic acid equivalent, QE= quercetin equivalent, แสดงค่าเป็น mean ± SD (*n*=3)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 การทดลองที่ 1 : การทดลองในเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณของสารสกัดใบมะยมที่พอเหมาะต่อการลดการเกิดแผลกระเพาะอาหารในหนู (Preliminary experiment)

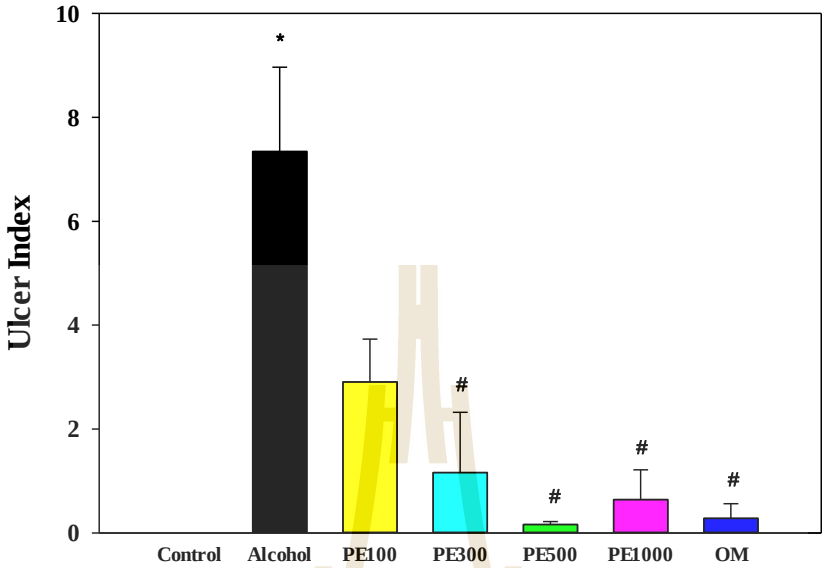
4.2.1 ดัชนีการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและค่าร้อยละการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูทดลอง



รูปที่ 1 แสดงการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย absolute alcohol Control= กลุ่มควบคุม; Alcohol=หนูทดลองได้รับน้ำเปล่า+absolute alcohol; PE100= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 100 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE300= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 300 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE500= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 500 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE1000= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 1000 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; OM= หนูทดลองได้รับยา Omeprazole ขนาด 40 mg/kg bodyweight + absolute alcohol

จากการสังเกตลักษณะกระเพาะอาหารของหนูทดลองด้วยตาเปล่าพบว่า หนูในกลุ่ม Control ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ absolute alcohol ไม่พบการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ในส่วนของกระเพาะของหนูกลุ่มตัวอย่างที่มีการชักนำให้เกิดแผลด้วย absolute alcohol ได้แก่กลุ่ม Alcohol, PE100, PE300, PE500, PE1000, และ OM พบว่าหนูในกลุ่ม Alcohol มีการเกิดแผลที่รุนแรงแผลมีลักษณะเป็นแบบ haemorrhagic erosion เลือดออกเป็นสีน้ำตาลดำขนาดใหญ่โดยแผลจะมีลักษณะนูนหนา มีการกระจายตัวอยู่ทั่วในกระเพาะอาหารส่วนคอร์ปัส (corpus) (รูปที่ 1) สำหรับหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 100 mg/kg bodyweight พบว่ากระเพาะอาหารมีลักษณะแผลคล้ายกับกลุ่ม Alcohol แต่ขนาดของแผลที่เกิดขึ้นมีจำนวนที่น้อยกว่า ในขณะที่กระเพาะอาหารหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 300, 500 และ 1,000 mg/kg bodyweight มีการเกิดแผลในกระเพาะอาหารแต่ไม่รุนแรง เลือดที่พบมีสีแดงสด แผลในกระเพาะอาหารส่วนคอร์ปัสมีขนาดเล็กน้อย เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม Alcohol และ PE100 และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะของแผลในกระเพาะอาหารของหนูในกลุ่ม PE300 PE500 และ PE1000 พบว่าหนูในกลุ่ม PE500 และ PE1000 ลักษณะของแผลในกระเพาะอาหารไม่ต่างกันและมีขนาดน้อยและจำนวนแผลน้อยกว่าหนูในกลุ่ม PE300 นอกจากนี้แผลใน

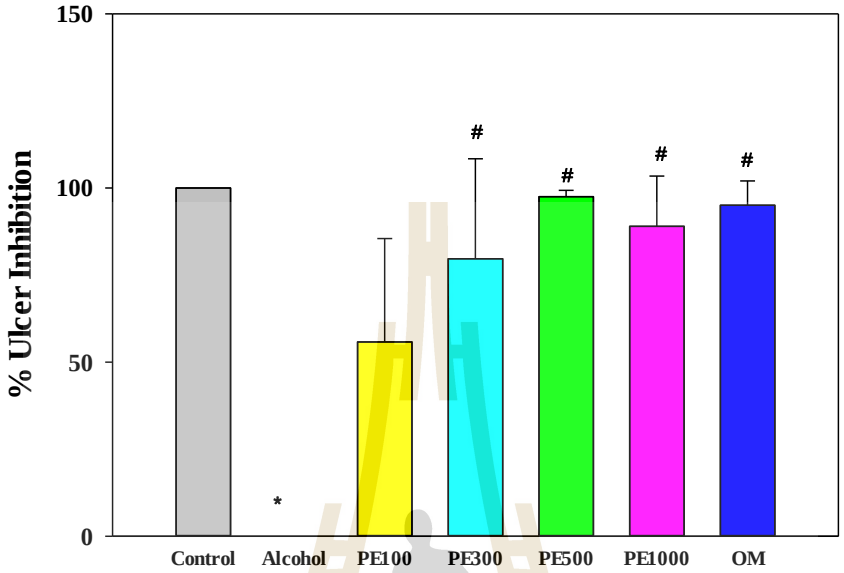
กระเพาะอาหารของหนูที่ได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 500 และ 1,000 mg/kg bodyweight มีลักษณะไม่ต่างจากแผลในกระเพาะอาหารของหนูที่ได้รับยา Omeprazole (รูปที่ 1)



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการลดค่า Ulcer Index หรือค่าร้อยละดัชนีแผลในกระเพาะอาหาร ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol: Control=กลุ่มควบคุม; Alcohol=หนูทดลองได้รับน้ำเปล่า+absolute alcohol; PE100= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 100 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE300= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 300 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE500= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 500 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE1000= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 1000 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; OM= หนูทดลองได้รับยา Omeprazole ขนาด 40 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; แสดงค่าเป็น mean ± SEM, n=3, * $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, # $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Alcohol

จากรูปที่ 2 พบว่าค่า Ulcer index (UI) หรือค่าดัชนีแผลในกระเพาะอาหารของหนูในกลุ่ม Alcohol มีค่ามากกว่า หนูในกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยค่า UI ของ Control และ Alcohol มีค่าเท่ากับ 0 และ 7.34 ± 2.29 ตามลำดับ นอกจากนี้ค่า UI ของหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะยม ในปริมาณ 100, 300, 500 และ 1,000 mg/kg bodyweight และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol มีค่าเท่ากับ 2.90±1.16, 1.16±1.64, 0.16±0.07 และ 0.64±0.81 ตามลำดับ (รูปที่2) โดยเฉพาะหนูในกลุ่ม PE300, PE500, และ PE1000 มีค่า UI น้อยกว่าหนูในกลุ่ม Alcohol อย่างมีนัย สำคัญ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบมะยมทุกขนาดความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูทดลองได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Alcohol โดยเฉพาะหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดใบมะยมในปริมาณ 500 และ 1,000 mg/kg bodyweight มีประสิทธิภาพในการลดค่าดัชนีการเกิดแผลได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่รับสารสกัดใบ

มะยม ขนาด 100 และ 300 mg/kg bodyweight โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะยม ขนาด 500 mg/kg bodyweight ช่วยลดดัชนีแผลในกระเพาะอาหารได้ดีที่สุดและมีค่า UI น้อยกว่าค่า UI ของกลุ่ม Omeprazole (รูปที่ 2)



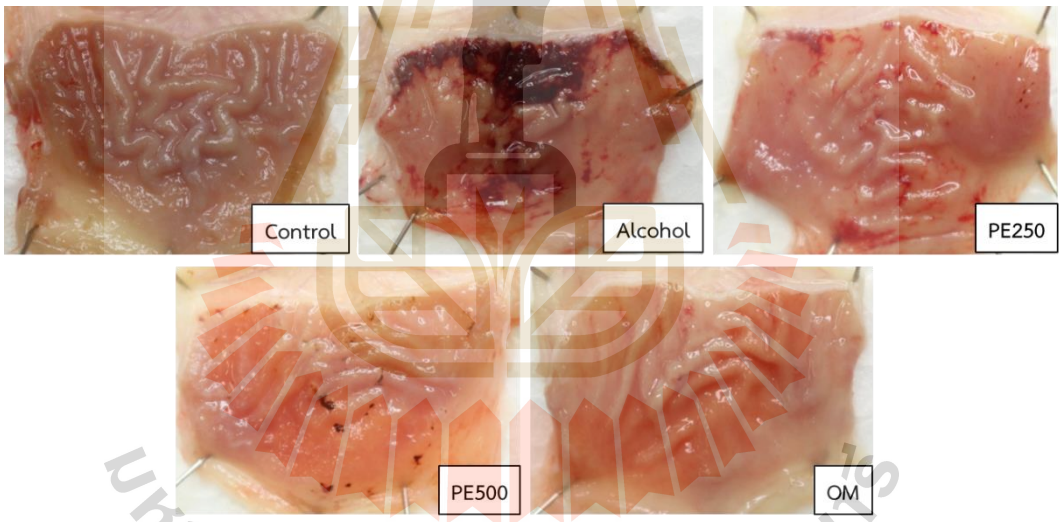
รูปที่ 3 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อค่า % Ulcer Inhibition หรือค่าเปอร์เซนต์ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol: Control=กลุ่มควบคุม; Alcohol=หนูทดลองได้รับน้ำเปล่า+absolute alcohol; PE100= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 100 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE300= หนูทดลองได้รับสกัดใบมะยมขนาด 300 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE500= หนูทดลองได้รับสกัดใบมะยมขนาด 500 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE1000= หนูทดลองได้รับสกัดใบมะยมขนาด 1000 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; OM= หนูทดลองได้รับยา Omeprazole ขนาด 40 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; แสดงค่าเป็น mean ± SEM, n=3, * $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, # $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Alcohol

ค่า % Ulcer inhibition หรือ ร้อยละการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูในกลุ่ม Control และ Alcohol มีค่าเท่ากับ 100% และ 0% ตามลำดับ (รูปที่ 3) หนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะยม ในปริมาณ 100, 300, 500 และ 1,000 mg/kg bodyweight มีค่า % Ulcer inhibition เท่ากับ 55.79±29.69, 79.71±28.68, 97.50±1.85 และ 95.84±6.95 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบมะยมสามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Alcohol โดยเฉพาะกลุ่ม PE500 และ PE1000 มีค่า % Ulcer inhibition มากกว่ากลุ่ม PE100 และ PE300 โดยที่กลุ่ม PE500 ช่วยป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ดีที่สุดและใกล้เคียงกับกลุ่ม Omeprazole ซึ่งเป็นยา (รูปที่ 3)

จากผลการทดลองข้างต้นที่กล่าวมาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า สกัดใบมะยมสามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะในระดับของเซลล์ได้ในทุกความเข้มข้นโดยหนูในกลุ่มที่ได้รับสกัดใบมะยมที่ความเข้มข้น 300 500 และ 1,000 mg/kg bodyweight สามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Alcohol ดังนั้นปริมาณใบมะยมที่จะนำมาใช้ป้อนหนูในการทดลองจริงคือ 250 และ 500 mg/kg bodyweight เนื่องจากปริมาณสกัดใบมะยม 1,000 mg/kg bodyweight เป็นปริมาณที่มากเกินไปและให้ผลไม่แตกต่างจากการป้อนสารสกัดใบมะยมในปริมาณ 500 mg/kg bodyweight ส่วนการป้อนสารสกัดใบมะยมในปริมาณ 250 mg/kg bodyweight จะแสดงให้เห็นว่าปริมาณใบมะยมสกัดส่งผลโดยตรงต่อการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร เพราะฉะนั้นปริมาณสารสกัดใบมะยมที่จะใช้ป้อนให้กับหนูทดลองในการทดสอบจริงคือ 250 และ 500 mg/kg bodyweight

4.3 การทดลองที่ 2: การศึกษาผลของการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยสารสกัดใบมะยมในหนูที่ถูกป้อนแอลกอฮอล์

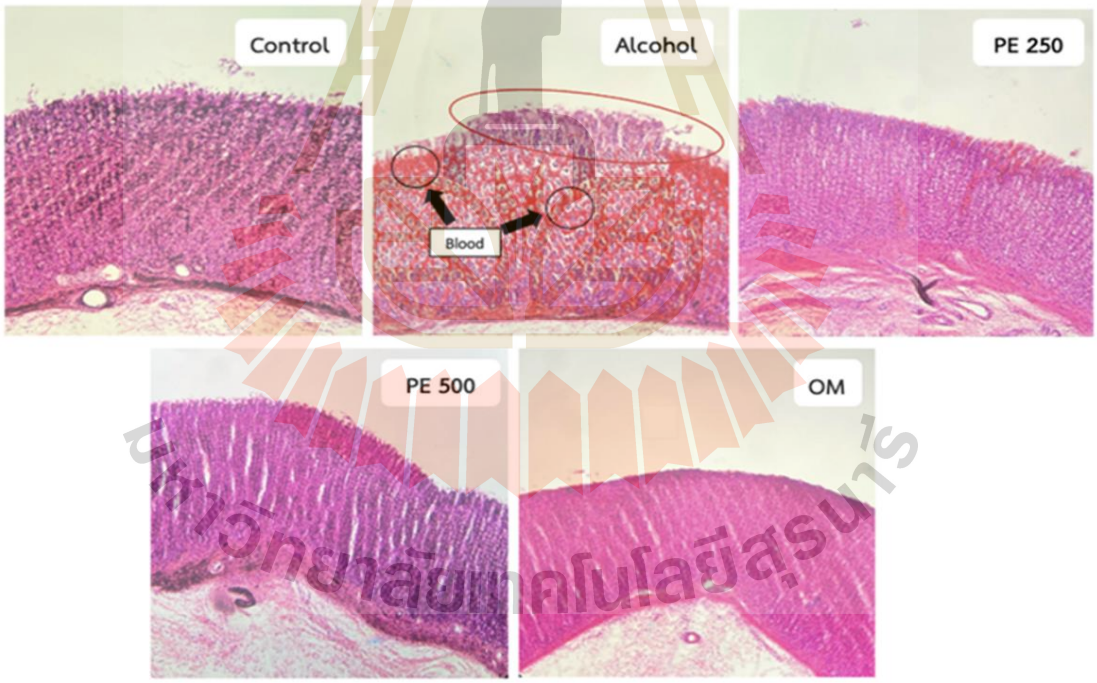
4.3.1 ดัชนีการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและค่าร้อยละการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูทดลอง



รูปที่ 4 แสดงการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย absolute alcohol: Control=กลุ่มควบคุม; Alcohol=หนูทดลองได้รับน้ำเปล่า+absolute alcohol; PE250= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 250 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE500= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 500 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; OM= หนูทดลองได้รับยา Omeprazole ขนาด 40 mg/kg bodyweight + absolute alcohol

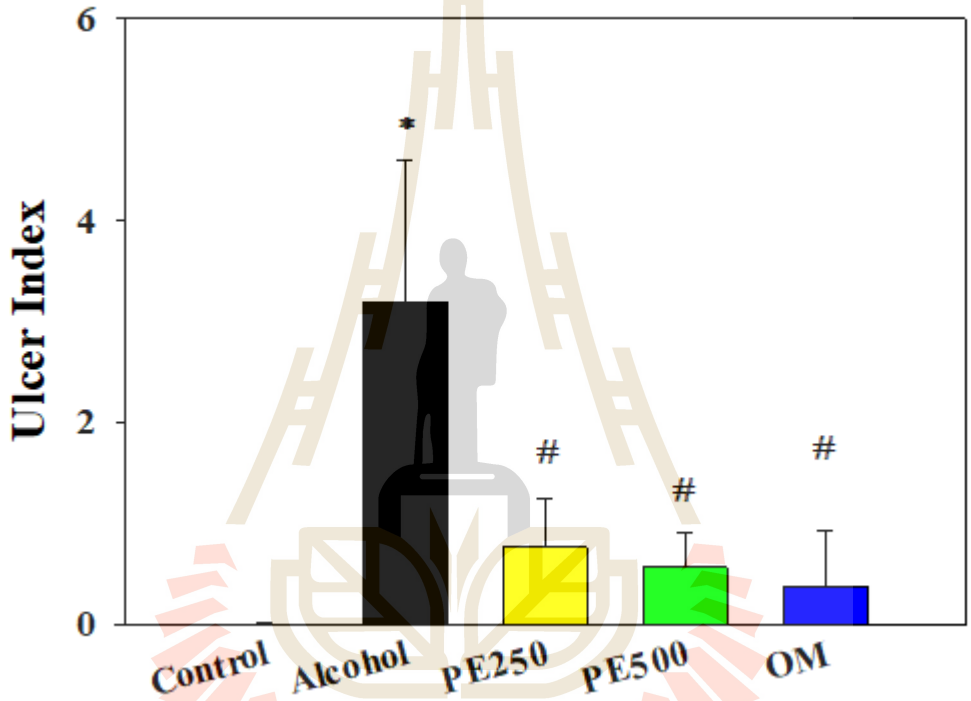
ผลของการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของสารสกัดใบมะยม ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย absolute alcohol ในกลุ่ม Alcohol พบว่า เกิดแผลขนาดใหญ่สีดำนูนที่มีเลือดออกแบบ haemorrhagic erosion ตรงบริเวณส่วนคอร์ปัสในชั้นของ mucosa เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม Control (รูปที่ 4) กระเพาะอาหารของหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดใบมะยม (250 และ 500 mg/kg bodyweight) ได้รับความเสียหายจากการได้รับ absolute ethanol ลดลง มีเลือดออกเป็นจุดเล็กน้อยตรงส่วนคอร์ปัส เมื่อเปรียบกับหนูในกลุ่ม Alcohol ในขณะที่กระเพาะอาหารของหนูที่ได้ Omeprazole (40 mg/kg bodyweight) ไม่พบความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วย absolute ethanol

จากผลการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในกระเพาะอาหารของกลุ่มหนูทดลอง โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X พบว่ากระเพาะอาหารของหนูในกลุ่ม Control ไม่พบความเสียหายเกิดขึ้น ในขณะที่หนูในกลุ่ม Alcohol เกิดความเสียหายตรงส่วนของ surface epithelium ของ mucosa โครงสร้างภายในของ mucosa เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงและเกิดการพังทลายและมีเลือดคั่งตั้งแต่ผิวหน้าไปจนถึงด้านในของ mucosa หนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะยม250 mg/kg bodyweight เกิดความเสียหายปานกลางบริเวณ surface epithelium ของ mucosa และภายใน mucosa มีการคั่งของเลือดและเกิดความเสียหายเพียงเล็กน้อย หนูทดลองในกลุ่ม PE500 เกิดความเสียหายเล็กน้อยตรงบริเวณ surface epithelium ของ mucosa ในขณะที่หนูทดลองในกลุ่ม Omeprazole ไม่พบความเสียหายเกิดขึ้น (รูปที่ 5) เนื่องจาก omeprazole เป็นยาลดการหลั่งกรดที่อยู่ในกลุ่ม proton pump inhibitor ใช้ในการรักษาแผลในทางเดินอาหาร (Shin และ Sachs, 2008)



รูปที่ 5 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในเซลล์กระเพาะอาหารหนูทดลอง: Control=กลุ่มควบคุม; Alcohol=หนูทดลองได้รับน้ำเปล่า+absolute alcohol; PE250= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 250 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE500= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 500 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; OM= หนูทดลองได้รับยา Omeprazole ขนาด 40 mg/kg bodyweight + absolute alcohol

รูปที่ 6 แสดงให้เห็นถึงผลของสารสกัดจากใบมะยมต่อดัชนีการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Alcohol ที่ได้รับ absolute alcohol มีค่าดัชนีการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (ulcer index) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม control ($p<0.05$) ในขณะที่หนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะยมปริมาณ 250 และ 500 mg/kg bodyweight และกลุ่มที่ได้รับยา Omeprazole มีค่า ulcer indexลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม Alcohol ($p<0.05$) ส่วนค่าร้อยละการป้องกัน (% ulcer inhibition) ของหนูกลุ่มPE250, PE500 และ Omeprazole มีค่าเท่ากับ 75.91%, 82.22% และ 88.17% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยหนูที่ได้รับสารสกัดใบมะยมปริมาณ 500 mg/kg bodyweight มีค่า ulcer index ที่ น้อยกว่า และมีค่า % ulcer inhibition ที่สูงกว่า หนูที่ได้รับสารสกัดใบมะยมในปริมาณ 250 mg/kg bodyweight



รูปที่ 6 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการลดค่า Ulcer Index หรือค่าร้อยละดัชนีแผลในกระเพาะอาหาร ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol: Control=กลุ่มควบคุม; Alcohol=หนูทดลองได้รับน้ำเปล่า+absolute alcohol; PE250= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 250 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; PE500= หนูทดลองได้รับสารสกัดใบมะยมขนาด 500 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; OM= หนูทดลองได้รับยา Omeprazole ขนาด 40 mg/kg bodyweight + absolute alcohol; แสดงค่าเป็น mean ± SD, n=6, * $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, # $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Alcohol

ผลของสารสกัดใบมะยมต่อ Total acidity pH และ ปริมาณน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของหนูทดลองแสดงในตารางที่ 2 พบว่าหนูทดลองในกลุ่ม Alcohol, PE250 และ OM มีค่า Total acidity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของค่า pH เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม control ($p<0.05$) ในขณะที่หนูทดลองที่ได้รับสารสกัดใบมะยมปริมาณ 500 mg/kg bodyweight มีค่า Total acidity และ pH ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่ม Control แต่เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่ม Alcohol พบว่าหนูในกลุ่ม PE500 มีค่า Total acidity ที่เพิ่มขึ้นและมีค่า pH ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

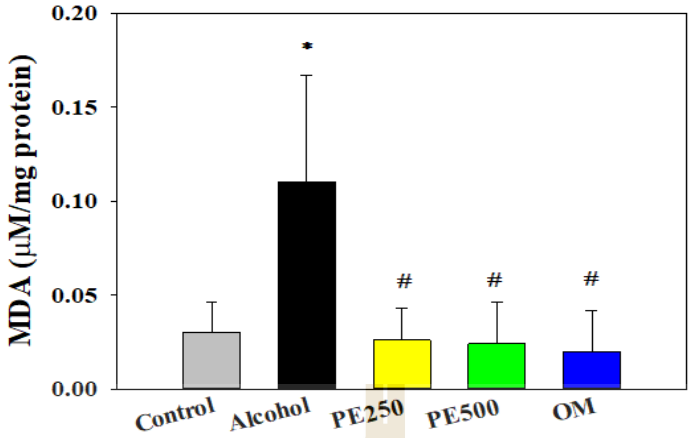
ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อค่า % Ulcer inhibition และ Total acidity, pH และปริมาณของเหลวในกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย absolute alcohol

Treatment	n	% Ulcer Inhibition	Total acidity (mEq/L)	pH	Volume (ml)
Control	6	-	12.25 ± 1.50	2.98 ± 0.94	1.91 ± 0.70
Alcohol	6	-	5.40 ± 1.34*	6.32 ± 0.43*	2.36 ± 0.46
PE250	6	75.91	8.20 ± 2.68*	5.48 ± 1.45*	2.75 ± 0.37
PE500	6	82.22	17.80 ± 6.69#	3.76 ± 0.67#	2.08 ± 0.41
OM	6	88.17	7.20 ± 1.79*	5.64 ± 0.77*	1.62 ± 0.74

ข้อมูลแสดงค่าเป็น mean ± SD, n=6, *p<0.05 vs Control, #p<0.05 Alcohol

4.3.2 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการเกิด Lipid oxidation ในกระเพาะอาหาร

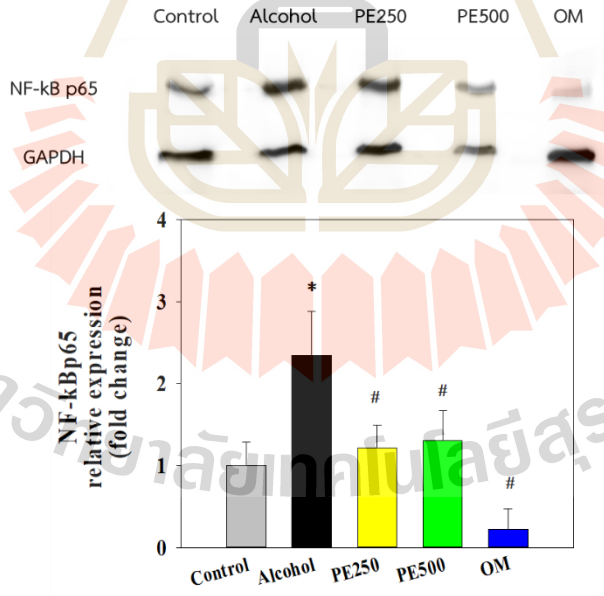
ผลของปริมาณ malondialdehyde (MDA) ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหนูทดลองในแต่ละกลุ่มถูกแสดงไว้ในรูปที่ 7 หนูทดลองในกลุ่ม Alcohol แสดงการเพิ่มขึ้นของระดับ MDA อย่างมีนัยสำคัญเมื่องเทียบกับหนูในกลุ่ม Control ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามระดับค่า MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่ได้รับสารสกัดใบมะยม (250 และ 500 mg/kg bodyweight) และ omeprazole (40 mg/kg bodyweight) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่ม Alcohol ($p<0.05$)



รูปที่ 7 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อ lipid oxidation ในตัวอย่างกระเพาะอาหารของหนูทดลอง ข้อมูลแสดงค่าเป็น mean ± SD, n=6, *p<0.05 vs Control, #p<0.05 Alcohol

4.3.3 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการแสดงออกในระดับโปรตีน NF-kB p65

การแสดงออกระดับโปรตีน NF-kB p65 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่ม alcohol เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม control (p<0.05) แต่อย่างไรก็ตามหนูในกลุ่มที่ได้รับสารใบมะยมสกัด (250 และ 500 mg/kg bodyweight) และ omeprazole (40 mg/kg bodyweight) ลดการการแสดงออกระดับโปรตีน NF-kB p65 อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในตัวอย่างกระเพาะของหนูทดลอง (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ผลของสารสกัดใบมะยมต่อการแสดงออกระดับโปรตีน NF-kB p65 ในตัวอย่างกระเพาะอาหารของหนูทดลอง ข้อมูลแสดงค่าเป็น mean ± SD, n=6, *p<0.05 vs Control, #p<0.05 Alcohol

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ใบมะยมสามารถนำมาใช้ได้ทั้งเป็นอาหารและเป็นยาในประเทศที่อยู่ในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะประเทศไทยที่ได้มีการนำใบมะยมมาใช้ในการรักษา ไข้ โรคความดัน และอาการปวดหัว (Pongboonrod 1959, Subhadrabandhu 2001, Teingburanathum 1999) นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยที่ได้รายงานว่า สารสกัดจากใบมะยม ที่ใช้น้ำหรือแอลกอฮอล์สกัดมีสรรพคุณที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพหลายด้าน อาทิเช่น ฤทธิ์ในการปกป้องตับจากสารพิษ (hepatoprotective activity) ต้านการอักเสบ ยับยั้งการทำงาน เอนไซม์ α-glucosidase ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด (Jain และคณะ 2011, Orwa และคณะ 2009, Abd Ghafar และคณะ 2018, Bhowmik และคณะ 2015) นอกจากนี้สารสกัดใบมะยมยังมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากใบมะยมมีองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระเช่น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารฟีนอลิก (Tan และคณะ 2020) Abd Ghafar และคณะ (2018) ได้รายงานว่า สาสกัดใบมะยมด้วยน้ำ มีองค์ประกอบของสารฟีนอลิก 21 ± 1 (GAE/g extract) และมีค่ายับยั้งอนุมูลอิสระ 30% (500 µg/ml) นอกจากนี้ Nguyen และคณะ (2012) ได้พบว่า ใบมะยมสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารฟีนอลิก 49.87 ± 0.23 (mg GAE/g crude extracts) และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ 0.70 ± 0.04 (mg quercetin/g crude extracts) และ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC50) เท่ากับ 88.68 ± 0.04 mg/ml จากผลการทดลองสารสกัดใบมะยม โดยการใช้น้ำสกัดมีองค์ประกอบของ สารกลุ่มฟีนอลิก (102.91 ± 0.09 mg GAE /g extract powder) และ ฟลาโวนอยด์ 339.60 ± 0.70 (mg QE /g extract powder) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบมะยมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 9.76 ± 0.92 (mg ascorbic acid/g extract powder) เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ 36.69 ± 0.32 (mmol $FeSO_4$/g extract powder) เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ซึ่งผลการทดลองได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้กล่าวมาในเบื้องต้น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาชนิดของสารฟีนอลิกในสารสกัดใบมะยมเพิ่มเติมในอนาคต

โรคแผลในกระเพาะอาหารเป็นโรครุนแรงและมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นทุกปีโดยมีการคาดการณ์ว่ามีประชากรที่เป็นโรคนี้อยู่ถึง 10% ของประชากรทั่วโลก (Beiranvand, Mohammad และคณะ 2021) ด้วยเหตุนี้ได้สร้างความท้าทายในการคิดค้นและพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาโรคนี้ โดยเฉพาะยาที่ผลิตจากพืชหรือสมุนไพรต่างๆเนื่องจากซึ่งมีข้อดีคือ ราคาไม่แพง มีผลข้างเคียงต่ำเมื่อเทียบกับยาที่ได้จากการสังเคราะห์ การศึกษาฤทธิ์ของพืชและสมุนไพรในการป้องกันโรคแผลในกระเพาะอาหารนั้นนิยมทดสอบในสัตว์ทดลองโดยการเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองนั้นเกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยการป้อนแอลกอฮอล์ความเข้มข้นสูง เนื่องจากแอลกอฮอล์ความเข้มข้นสูงสามารถซึมผ่านทะลุเข้าไปในเยื่อบุกระเพาะอาหารได้ง่าย โดยแผลในกระเพาะอาหารที่เกิดขึ้นจะเกิดการการบวมของชั้นใต้เยื่อบุผิวเป็นบริเวณวงกว้าง มีเลือดออก เซลล์บุผิวลอกออกมา เกิดการอักเสบของเซลล์ และเกิดการปล่อยกรดออกมาในกระเพาะเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับแอลกอฮอล์ไปใช้ช่วง 60 นาทีแรก (Sidahmed และคณะ 2013, Park SW และคณะ 2008, Silva MI และคณะ 2009) ซึ่งได้สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าหนูในกลุ่ม alcohol ที่ได้รับแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ได้เกิดแผลที่มีเลือดออกตรงบริเวณกระเพาะอาหาร แผลมีลักษณะบวมนูน มีการตายของเนื้อเยื่อและมีค่า ulcer index ที่สูงกว่าหนูในกลุ่ม control แต่

อย่างไรก็ตามสารสกัดใบมะยม (250 และ 500 mg/kg bodyweight) ช่วยป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและลดค่า ulcer index อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่า % ulcer inhibition ที่มากกว่าหนูในกลุ่ม alcohol ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้ศึกษาการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการป้องกันโรคแผลในกระเพาะอาหาร (Armah และคณะ 2021, Al-Wajeeh และคณะ 2017) เมื่อเปรียบเทียบผลในการลดแผลในกระเพาะอาหารของสารสกัดใบมะยมกับยา omeprazole พบว่า สารสกัดใบมะยมสามารถลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร, ulcer index และ เพิ่ม % ulcer inhibition ได้ใกล้เคียงกับยา omeprazole ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลกระเพาะอาหาร โดยตัวยา omeprazole นั้นเป็นยาในกลุ่ม Proton pump Inhibitors ทำหน้าที่ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ซึ่งจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ H+/K+ ATPase pump ที่เซลล์ผนังกระเพาะอาหาร (Wallmark 2009)

นอกจากนี้กระเพาะอาหารในหนูในกลุ่ม alcohol, PE250 และ omeprazole มีค่า total acidity ที่ลดลง และ มีการเพิ่มขึ้นของค่า pH ในกระเพาะอาหารอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม control (Table 2) ในการทดลองนี้พบว่า มีเพียงหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดใบมะยม 500 mg/kg bodyweight ที่มีค่า total acidity เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการลดลงของค่า pH ในกระเพาะอาหารอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ หนูในกลุ่ม alcohol ซึ่งผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ผ่านมา Izhar และคณะ (2021) ได้รายงานว่า หนูทดลองที่ได้รับแอลกอฮอล์บริสุทธิ์จะเกิดแผลในกระเพาะอาหาร และมีค่า total acidity ในกระเพาะอาหารที่เพิ่มขึ้นและมีค่า pH ลดลงเมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม และสารสกัดจากพืช *Phyllanthus reticulatus* นั้นช่วยป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับการลดค่า total acidity และเพิ่มค่า pH ในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ Gong และคณะ (2021) ได้รายงานว่าหนูทดลองที่ได้รับ hydrochloric acid/ethanol จะมีค่า total acidity ในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้นและมีค่า pH ลดลง เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม จากรายงานของ McConnell (2008) ได้ระบุว่าค่า pH ของกระเพาะอาหารในหนูทดลองที่ผ่านการอดอาหารมา 1 คืน มีค่าอยู่ที่ประมาณ pH 3 และ pH 4 ในหนูที่ได้รับอาหารปกติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของหนูในกลุ่ม control ที่มีค่า pH ในกระเพาะอาหารอยู่ที่ประมาณ pH 3 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบมะยมปริมาณ 500 mg/kg bodyweight ช่วยป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่เกิดจากแอลกอฮอล์ส่งผลให้สภาวะของกระเพาะนั้นปกติใกล้เคียงกับหนูกลุ่มcontrol ส่วนสาเหตุของการลดลงของค่า total acidity และการเพิ่มขึ้นของค่า pH ในกระเพาะอาหารของหนูในกลุ่ม alcohol, PE250 และ omeprazole นั้นอาจมาจากกระบวนการป้องกันของกระเพาะอาหารที่ปรับสภาพ pH ของกระเพาะอาหารให้กลับมาอยู่ในสภาวะปกติ โดยการหลั่งสาร bicarbonate ผ่านทาง sodium-bicarbonate co-transport (Allen และคณะ 2005, Nassini และคณะ 2010)

การป้อนแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ให้กับหนูทดลองนั้นนอกจากจะกระตุ้นให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารแล้ว แอลกฮอล์ยังเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress และ inflammation ในกระเพาะอาหาร (Bhattacharyya และคณะ 2012) เนื่องจากแอลกอฮอล์ เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต reactive oxygen species และลดกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Tamura และคณะ 2012) ก่อให้เกิดกระบวนการ lipid oxidation โดยสามารถตรวจสอบได้จากปริมาณ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการเกิด oxidative stress นอกจากนี้ oxidative stress ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งสาร pro-inflammatory mediators (Handa และคณะ 2011, Minatel และคณะ 2016, Zhang และคณะ 2008) ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบขึ้นมา (Zhang และคณะ 2008) โดย Nuclear factor-kappa B (NF-kB) เป็น

transcription factor ที่สำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการอักเสบในเซลล์ Ren และคณะ (2021) และของ Fu และคณะ (2018) ได้รายงานว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหนูที่ได้รับแอลกอฮอล์จะมีปริมาณ (MDA) และการแสดงออกระดับโปรตีน NF-kB p65 ที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับแอลกอฮอล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของงานวิจัยนี้ที่ได้พบว่าหนูในกลุ่ม alcohol แสดงการเกิดแผลในกระเพาะอาหารซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณ MDA และ การแสดงออกระดับโปรตีน NF-kB p65 เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม control ซึ่งบ่งชี้ว่า แอลกอฮอล์เหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress และการอักเสบในกระเพาะอาหาร แต่อย่างไรก็ตามหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดใบมะยมในปริมาณ 250 และ 500 mg/kg bodyweight และยา omeprazole ปริมาณ 40 mg/kg bodyweight 1 ชั่วโมงก่อนการป้อนแอลกอฮอล์ ช่วยลดการเกิด oxidative stress และการอักเสบในกระเพาะอาหารอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด oxidative stress และ การอักเสบในกระเพาะอาหารของสารสกัดใบมะยมส่วนหนึ่งน่าจะมาจากสารพฤกษเคมีเช่น สารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในใบมะยม (Mousa และคณะ 2019) แต่อย่างไรก็ตามในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระเช่น superoxide dismutase (SOD) catalase และ glutathione peroxidase (GSH-Px) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione (GSH) และปริมาณสาร pro-inflammatory cytokine ต่างๆ เช่น TNF-α IL-1β IL-6 เพื่อยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดใบมะยมในการยับยั้ง oxidative stress และการอักเสบในกระเพาะอาหาร

5.2 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำขนาด 250 และ 500 mg/kg bodyweight สามารถลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในหนู Wistar ที่ได้รับแอลกอฮอล์บริสุทธิ์โดยที่ความสามารถในการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของใบมะยมนั้นอาจเกิดจากสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในใบมะยมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระส่งผลให้บรรเทาการเกิด oxidative stress และการอักเสบในกระเพาะอาหาร

5.3 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องชนิดของสารฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในใบมะยมและฤทธิ์ของสารสกัดใบมะยมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งกรด ได้แก่ H+/K+ ATPase pump และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระได้แก่เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), ,catalase และ glutathione peroxidase (GSH-Px) และ proinflammatory cytokines ต่างๆเช่น TNF-α, IL-1β, IL-6 เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดลองและสามารถอธิบายกระบวนการในการลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร, oxidative stress และ การอักเสบได้

บรรณานุกรม

Abd Ghafar, S.Z., Mediani, A., Maulidiani, Ramli, N.S., Abas, F., 2018. Antioxidant, α-glucosidase, and nitric oxide inhibitory activities of *Phyllanthus acidus* and LC–MS/MS profile of the active extract. Food Bioscience: 25, 134–140.

Alimi, H., Hfaiedh, N., Bouoni, Z., Sakly, M., BenRhouma, K. 2011. Evaluation of Antioxidant and Antiulcerogenic Activities of Opuntia Ficus Indica F. Inermis Flowers Extract in Rats. Environmental Toxicology and Pharmacology: 32: 406–416.

Allen, A., Flemstrom, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. American Journal of Physiology-Cell Physiology: 288: C1–19.

Al-Wajeeh, N.S., Hajerezaie, M., Noor, S.M., Halabi, M.F., Al-Henhena, N., Azizan, A.H., Kamran, S., Hassandarvish, P., Shwter, A.N., Karimian, H., Ali, H.M., Abdulla, M.A. 2017. The gastro protective effects of Cibotium barometz hair on ethanol-induced gastric ulcer in Sprague-Dawley rats. BMC veterinary research: 13: 27. https://doi.org/10.1186/s12917-017-0949-z

Arda-Pirincci, P., Bolkent, S., Yanardag, R. 2006. The Role of Zinc Sulfate and Metallothionein in Protection Against Ethanol-Induced Gastric Damage in Rats. Digestive Diseases and Sciences: 51: 2353-2360.

Armah, F.A., Henneh, I.T., Alake, J., Ahlidja, W., Amoani, B., Ofori, E.G., Asante-Kyei, B., Temitayo, G.I., Adokoh, C. K. 2021. Allanblackia floribunda Seed Extract Attenuates the Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats via the Inhibition of TNF-α and INF-γ Levels and Modulation in the Expression of Ki67 Protein. BioMed research international. 6694572. https://doi.org/10.1155/2021/6694572

Balogun, M.E., Besong, E.E., Obimma, J.N., Djobissie, S.F.A., Mbamalu, O. S. 2018. Gastroprotective Effect of Ethanolic Extract of Vigna Subterranea in Ethanol-induced Gastric Mucosal Ulceration in Rats. Indian Journal of Physiology and Pharmacology: 62: 347-358.

Beiranvand, M., Bahramikia, S, Dezfoulia, O. 2021. Evaluation of antioxidant and anti-ulcerogenic effects of Eremurus persicus (Jaub & Spach) Boiss leaf hydroalcoholic extract on ethanol-induced gastric ulcer in rats. Inflammopharmacology: 29 :1503-1518. doi:10.1007/s10787-021-00868-x

Benzie, I.E.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”. The FRAP assay. Analytical Biochemistry: 239:70–76.

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E. 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. Physiological Reviews: 94: 329–354. doi: 10.1152/physrev.00040.2012.

Bhowmik, A., Sarkar, K., Ghosh, R., Das, L., 2015. Hepatoprotective and hypoglycemic activity of *Phyllanthus acidus* leaf extract in Wister albino rats. Int. Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences: 4: 9–16.

Cadirci, E., Suleyman, H., Aksoy, H., Halici, Z., Ozgen, U., Koc, A., Ozturk, N. 2007. Effects of Onosma Armeniacum Root Extract on Ethanol-Induced Oxidative Stress in Stomach Tissue of Rats. Chemico-Biological Interactions: 170: 40–48.

Chainum-aom, N., Chomko, S., Talubmook, C. 2016. Effects of *Phyllanthus acidus* Leaf Extract on Hypoglycemic Activity in Normal and Diabetic Rats. ARPN Journal of Science and Technology: 6: 110-113.

Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis: 10:178–182

Chongsam, W., Kanokwiroon, K., Jansakul, C. 2015. Effects of 6 weeks oral administration of *Phyllanthus acidus* leaf water extract on the vascular functions of middle-aged male rats. Journal of Ethnopharmacology: 176: 79-89.

de Araújo, E.R.D., Guerra, G.C.B., Araújo, D.F.S., de Araújo, A.A., Fernandes, J.M., de Araújo Júnior, R.F., da Silva, V.C., de Carvalho, T.G., Ferreira, L.S., Zucolotto, S.M. 2018. Gastroprotective and Antioxidant Activity of Kalanchoe brasiliensis and Kalanchoe pinnata Leaf Juices against Indomethacin and Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. International Journal of Molecular Sciences. 19: doi: 10.3390/ijms19051265.

De Lira Mota, K.S., Dias, G.E.N., Pinto, M.E.F., Luiz-Ferreira, Â., Monteiro Souza-Brito, A.R., Hiruma-Lima, C.A., Barbosa-Filho, J.M., Batista, L.M. 2009. Flavonoids with Gastroprotective Activity. Molecules: 14: 979–1012.

Fatriyawan, A.A., Mahdi, C., Aulanni'am Aulanni'am, DyahKinasih Wuragil. 2016. The ethanolic extracts therapy of ceremai leaves (*Phyllanthus acidus* (L.)skeels) on malondialdehyde (MDA) levels and histopathology of hepar of hypercholesterolemic rats. International Journal of ChemTech Research: 904: 509-512.

Fu, Y., Wu, H.Q., Cui, H.L., Li, Y.Y., Li, C.Z. 2018. Gastroprotective and anti-ulcer effects of oxymatrine against several gastric ulcer models in rats: Possible roles of antioxidant, antiinflammatory, and prosurvival mechanisms. Phytotherapy research: PTR: 32: 2047–2058. https://doi.org/10.1002/ptr.6148

Goel, R.K., Bhattacharya, S.K. 1991. Gastroduodenal mucosal defense and mucosal protective agents. Indian Journal of Experimental Biology: 29: 701–714.

Gong, G., Zhao, R., Zhu, Y., Yu, J., Wei, B., Xu, Y., Cui, Z., Liang, G. 2021. Gastroprotective effect of cirsilineol against hydrochloric acid/ethanol-induced gastric ulcer in rats. The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology: 25: 403–411. https://doi.org/10.4196/kjpp.2021.25.5.403

Guslandi, M. 1987. Effects of Ethanol on the Gastric Mucosa. Digestive Diseases: 5: 21–32.

Guzmán-Gómez, O., García-Rodríguez, R.V., Quevedo-Corona, L., Pérez-Pastén-Borja, R., Rivero-Ramírez, N.L., Ríos-Castro, E., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-Ramos, J., Chamorro-Cevallos, G.A. (2018). Amelioration of Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Rats Pretreated with Phycobiliproteins of Arthrospira (Spirulina) Maxima. Nutrients: 10, pii: E763. doi: 10.3390/nu10060763.

Handa, O., Naito, Y., Yoshikawa, T. 2011. Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of Helicobacter pylori. Redox Report: 16: 1–7. doi:10.1179/174329211X12968219310756

Izhar, H., Shabbir, A., Shahzad, M., Mobashar, A., Ahmed, S.S. 2021. Phyllanthus reticulatus Prevents Ethanol-Induced Gastric Ulcer via Downregulation of IL-8 and TNF-α Levels. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM: 1734752. https://doi.org/10.1155/2021/1734752

Jagajothi, A., Manimekalai, G., Evanjelene, V.K., Nirmala, A. 2014. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Phyllanthus acidus*. International Journal of Innovation in Science and Mathematics: 2, 55-62.

Jain, N.K., Lodhi, S., Jain, A., Nahata, A., Singhai, A.K., 2011. Effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels fruit on carbon tetrachloride-induced acute oxidative damage in livers of rats and mice. Journal of Chinese integrative medicine: 9, 49–56.

Jain, N.K., Singhai, A.K. 2011. Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 4: 470-474.

Kumar, S., Sandhir, R., Ojha, S. 2014. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of Lantana camara leaves. BMC Research Notes: 7:560. doi: 10.1186/1756-0500-7-560. PMID: 25145266; PMCID: PMC4156633.

Kuna, L., Jakab, J., Smolic, R., Raguz-Lucic, N., Vcev, A., Smolic, M. 2019. Peptic Ulcer Disease: A Brief Review of Conventional Therapy and Herbal Treatment Options. Journal of Clinical Medicine: 8, pii: E179. doi: 10.3390/jcm8020179.

Li, W., Huang, H., Niu, X., Fan, T., Mu, Q., Li, H. 2013. Protective effect of tetrahydrocoptisine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. Toxicology and Applied Pharmacology. 272: 21–29.

Liaotrakoon, W., Liaotrakoon, V. 2021. Influence of spray-drying and freeze-drying on anthocyanins and antioxidant activities of *Phlebopus colossus* (R. Heim) Singer powder. Journal of Food Technology, Siam University: 16, 134–147. https://li01.tci-thaijo.org/index.php/JFTSU/article/view/250921

Mabrok, H.B., Mohamed, M.S. 2019. Induction of COX-1, suppression of COX-2 and pro-inflammatory cytokines gene expression by moringa leaves and its aqueous extract in aspirin-induced gastric ulcer rats. Molecular Biology Reports: doi: 10.1007/s11033-019-04874-9.

McConnell, E.L., Basit, A.W., Murdan, S. 2008. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. The Journal of pharmacy and pharmacology: 60: 63–70. https://doi.org/10.1211/jpp.60.1.0008

Melchiorri, D., Sewerynek, E., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Poeggeler, B., Nisticò, G. 1997. Suppressive Effect of Melatonin Administration on Ethanol-Induced Gastroduodenal Injury in Rats in Vivo. British Journal of Pharmacology: 121: 264–270.

Minatel, I.O., Francisqueti, F.V., Corrêa, C.R., Lima, G.P. 2016. Antioxidant Activity of γ-Oryzanol: A Complex Network of Interactions. International journal of molecular sciences. 17: 1107. https://doi.org/10.3390/ijms17081107

Mousa, A.M., El-Sammad, N.M., Hassan, S.K., Madboli, A., Hashim, A.N., Moustafa, E.S., Bakry, S.M., Elsayed, E.A. 2019. Antiulcerogenic effect of Cuphea ignea extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. BMC complementary and alternative medicine: 19: 345. https://doi.org/10.1186/s12906-019-2760-9

Nariya, P.B., Bhalodia, N.R., Shukla, V.J., Acharya, R., Nariya, M.B. 2013. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of *Cordia dichotoma* (Forst f.) bark. Ayu: 34: 124-128. doi: 10.4103/0974-8520.115451. PMID: 24049418; PMCID: PMC3764870.

Nassini, R., Andrè, E., Gazzieri, D., De Siena, G., Zanasi, A., Geppetti, P., Materazzi, S. 2010. A bicarbonate-alkaline mineral water protects from ethanol-induced hemorrhagic gastric lesions in mice. Biological & pharmaceutical bulletin: 33: 1319–1323. https://doi.org/10.1248/bpb.33.1319

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Anthony, S., 2009. Agroforestree Database: a Tree Reference and Selection Guide Version 4.0: http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp.

Pan, J.-S., He, S.-Z., Xu, H.-Z., Zhan, X.-J., Yang, X.-N., Xiao, H.-M., Shi, H.-X., Ren, J.-L. 2008. Oxidative Stress Disturbs Energy Metabolism of Mitochondria in Ethanol-Induced Gastric Mucosa Injury. World Journal of Gastroenterology: 14: 5857–5867.

Park, S.W., Oh. T.Y., Kim, Y.S., Sim, H., Park, S.J., Jang, E.J., Park, J.S., Baik, H.W., Hahm, K.B. 2008. Artemisia asiatica extracts protect against ethanol-induced injury in gastric mucosa of rats. Journal of Gastroenterology and Hepatology: 23: 976–984.

Pongboonrod, S. 1959. Mai Thet Muang Thai. Kasembunnakich Press, Bangkok: pp. 148.

Promyo, K., Cho, J.Y., Park, K.H., Jaiswal, L., Park, S.Y., Ham, K.S. 2017. Artemisia scoparia attenuates amyloid β accumulation and tau hyperphosphorylation in spontaneously hypertensive rats. Food Science and Biotechnology: 26:775-782. Published 2017 Jun 19. doi:10.1007/s10068-017-0077-3.

Ren, S., Chen, B., Ma, Z., Hu, H., Xie, Y. 2021. Polygonum hydropiper extract attenuates ethanol-induced gastric damage through antioxidant and anti-inflammatory pathways. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 54: e10841. doi:10.1590/1414-431X2020e10841.

Schubert, M.L. 2004. Gastric secretion. Current Opinion in Gastroenterology: 20: 519–525.

Shang, H.M., Zhou, H.Z., Li, R., Duan, M.Y., Wu, H.X., Lou, Y.J. 2017. Extraction optimization and influences of drying methods on antioxidant activities of polysaccharide from cup plant (*Silphium perfoliatum* L.). PloS one. 12: e0183001. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183001.

Shin, J.M., Sachs, G. 2008. Pharmacology of proton pump inhibitors. Current Gastroenterology Reports: 10: 528–534.

Sidahmed, H.M., Azizan, A.H., Mohan, S., Abdulla, M.A., Abdelwahab, S.I., Taha, M.M., Hadi, A.H., Ketuly, K.A., Hashim, N.M., Loke, M.F., Vadivelu, J. 2013. Gastroprotective effect of desmosdumotin C isolated from Mitrella kentia against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhage in rats: possible involvement of glutathione, heat-shock protein-70, sulfhydryl compounds, nitric oxide, and anti helicobacter pylori activity. BMC Complementary Medicine and Therapies: 13:183.

Silva, M.I., Moura, M.A., de Aquino Neto, M.R., da Rocha, T.A., Rocha, N.F., de Carvalho, A.M., Macêdo, D.S., Vasconcelos, S.M., de Sousa, D.P., Viana, G.S., de Sousa, F.C. 2009. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 380: 233–245.

Subhadrabandhu, S. 2001. Under-utilized Tropical Fruits in Thailand. RAP Publication, Bangkok, pp. 37–38.

Tamura, M., Matsui, H., Kaneko, T., Hyodo, I. 2013. Alcohol is an oxidative stressor for gastric epithelial cells: detection of superoxide in living cells. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 53: 75– 80. doi: 10.3164/jcbn.13-32.

Tan, S.P., Tan, E.N., Lim, Q.Y., Nafiah, M.A. 2020. *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties. Journal of Ethnopharmacology: 10: 253:112610. doi: 10.1016/j.jep.2020.112610.

Teingburanathum, V., 1999. Thai Medicinal Plant Dictionary, fifth ed. Roumsarn Press, Bangkok: pp. 633–643.

Vonkeman, H.E., Klok, R.M., Postma, M.J., Brouwers, J.R., VanDeLaar, M.A. 2007. Direct Medical Costs of Serious Gastrointestinal Ulcers among Users of Nsaids. Drugs Aging: 24: 681–690.

Wallmark, B. Mechanism of Action of Omeprazole. 1986. Scandinavian Journal of Gastroenterology: 21: 11–16. DOI: 10.3109/00365528609090881

Zhang, K.Z., Kaufman, R.J. 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature: 454: 455–462. doi: 10.1038/nature07203.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

อ.ดร.กิติพงษ์ พรมโย เกิดเมื่อวันที่ 30 พฤษภาคม 2526 จังหวัดลำพูน จบการศึกษาระดับปริญญาเอกจาก Mokpo national university จากประเทศเกาหลีใต้ คณะ Food Engineering ในปี 2015 และรับทุน Post-doctoral Fellow ในปี 2015-2018 ที่ Mokpo national university และ 2018-2019 ที่ มหาวิทยาลัยมหิดล ปัจจุบันเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา มีความชำนาญพิเศษทางด้าน Functional food, Nutritional biochemistry, Animal study ในปัจจุบันได้เคยทำการวิจัยที่เป็นหัวหน้าโครงการ 3 โครงการ มีสิ่งตีพิมพ์นานาชาติ 6 บทความและสิทธิบัตรต่างๆในช่วง postdoc ที่ Mokpo national university

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี