

ฉันทน์ว้ตรี มานะเสถียร : อธิพลของสารสกัดท้บทีม *Punica granatum* ต่อการต้าน ออกซิเดชัน การฉายรังสีอัลตราไวโอเลตบีบนผิวหนังหนูแรท และการตายแบบอะพอพโทสิส ของเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ เอ็มซีเอฟ-7 (THE EFFECTS OF POMEGRANATE *PUNICA GRANATUM* EXTRACTS ON ANTIOXIDATION, ULTRAVIOLET B IRRADIATION ON RAT SKIN AND APOPTOSIS OF MCF-7, HUMAN BREAST CANCER CELLS)  
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.กรกช อินทราพิเชฐ, 197 หน้า.

การศึกษาคณสมบัตินของเปลือท้บทีมสกัดด้วยเอทธานอล (PPEE) เปลือท้บทีมสกัดด้วยน้ำ (PPWE) เมล็ดท้บทีมสกัดด้วยเอทธานอล (PSEE) เมล็ดท้บทีมสกัดด้วยน้ำ (PSWE) และ น้ำท้บทีม (PJ) ต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน การป้องกันการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตบีบนผิวหนังหนูแรท และการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ (เอ็มซีเอฟ-7) การทดลองพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมสามารถเรียงจากมากไปน้้อยดังนี้ PPEE > PPWE > PSEE > PSWE > PJ ( $451.96 \pm 4.29$   $380.54 \pm 4.29$   $77.93 \pm 1.62$   $51.58 \pm 0.85$  และ  $2.55 \pm 0.42$   $\mu\text{g GAE/mg}$  ตามลำดับ) เช่นเดียวกับปริมาณฟลาโวนอยด์คือ PPEE > PPWE > PSEE > PSWE > PJ ( $37.61 \pm 1.44$   $26.05 \pm 0.93$   $16.66 \pm 0.47$   $10.55 \pm 0.14$  และ  $0.24 \pm 0.03$   $\mu\text{g CAE/mg}$  ตามลำดับ) ความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้ง 50 เปอร์เซนต์ ( $\text{IC}_{50}$ ) ซึ่งเกี่ยวข้องถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชันสามารถคำนวณได้จากกรยับยั้งอนุมูล DPPH การลดเฟอริก และการยับยั้งออกซิเดชันของไลปิด โดยสามารถจัดลำดับค่าความสามารถจากสูงไปถึงต่ำได้ดังต่อไปนี้ PPEE ( $121.65 \pm 2.66$   $49.07 \pm 1.53$  และ  $15.15 \pm 2.46$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) > PPWE ( $151.78 \pm 2.70$   $64.63 \pm 1.23$  และ  $20.42 \pm 2.87$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) > PSEE ( $1,324.35 \pm 16.89$   $512.54 \pm 15.05$  และ  $166.49 \pm 20.38$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) > PSWE ( $2,577.53 \pm 44.06$   $753.17 \pm 17.66$  และ  $201.82 \pm 11.37$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) > PJ ( $9,925.20 \pm 1,116.80$   $4,615.94 \pm 28.90$  และ  $688.87 \pm 44.03$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) และพบว่า ทั้งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมหรือปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัด มีความสัมพันธ์ต่อกิจกรรมการต้านการออกซิเดชัน ความเข้มข้นของสารที่มีผลต่อการตายร้อยละ 50 ของไรน้ำเค็ม ( $\text{LC}_{50}$ ) จากการวิเคราะห์การตายของไรน้ำเค็ม (BSLA) ความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถแสดงผลจากมากไปน้้อยคือ PPEE ( $1,206.98 \pm 12.73$   $\mu\text{g/ml}$ ) > PSWE ( $1,294.88 \pm 61.28$   $\mu\text{g/ml}$ ) > PPWE ( $1,743.31 \pm 20.17$   $\mu\text{g/ml}$ ) > PSEE ( $2,375.28 \pm 69.54$   $\mu\text{g/ml}$ ) > PJ ( $6,451.46 \pm 52.32$   $\mu\text{g/ml}$ ) และพบว่า ทั้งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์ ไม่มีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษต่อเซลล์ ความสัมพันธ์ในการตอบสนองต่อปริมาณที่ใช้ของสารจากการต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งแสดงจากขอบเขตความปลอดภัยของสาร (MOS) และดัชนีการรักษา (TI) สามารถเรียงลำดับจากมากไปน้้อยคือ PPWE (125

และ 11.49 ตามลำดับ) > PPEE (75 และ 9.92 ตามลำดับ) > PSEE (5 และ 1.79 ตามลำดับ) > PJ (3 และ 0.65 ตามลำดับ) > PSWE (0.5 และ 0.5 ตามลำดับ) การใช้สารสกัดเปลือกทับทิมต่อการป้องกันแสง 3xMED UVB บนผิวหนังหนูแรท การศึกษาครั้งแรกนี้พบว่า PPEE และ PPWE ลดผื่นแดงของผิวหนัง (2.5 และ 1.8 เท่า) ลดเซลล์เม็ดเลือดในการอักเสบลง (4.7 และ 1.9 เท่า) ลดความหนาของเนื้อเยื่อผิวหนัง (1.7 และ 1.6 เท่า) ลดจำนวน sunburn cells (7.4 และ 7.2 เท่า) และยับยั้งการแตกหักของดีเอ็นเอ จากสาเหตุโดยการให้รังสี UVB ในการประเมินการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยวิธี Trypan blue MTT และ Resazurin เมื่อพิจารณาจากค่า  $LC_{50}$  ที่ 24 ชั่วโมง PPEE ( $347.83 \pm 11.85$   $377.88 \pm 13.14$  และ  $471.50 \pm 13.62$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) มีประสิทธิภาพมากกว่า PPWE ( $365.93 \pm 20.00$   $459.90 \pm 15.90$  และ  $589.45 \pm 16.21$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) และพบการแตกหักของดีเอ็นเอและลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 สารสกัดจากเปลือกทับทิมสามารถชักนำให้เกิด การยับยั้งการเจริญเติบโต ลักษณะกายวิภาคแบบอะพอพโทซิส และการแตกหักของ DNA ซึ่งขึ้นกับปริมาณสารและระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ สารสกัดเปลือกทับทิมชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสสามารถยืนยันผ่านการแสดงออกของระดับโปรตีน Bcl-2 procaspase-9 procaspase-7 และ PARP สรุปแล้วสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีศักยภาพสูงในการต้านออกซิเดชัน ช่วยป้องกันผิวหนังจาก UVB ด้านการเกิดมะเร็ง และมีความปลอดภัยในการใช้สูง

สาขาวิชาชีววิทยา

ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม \_\_\_\_\_

JINNAWAT MANASATHIEN : THE EFFECTS OF POMEGRANATE  
*PUNICA GRANATUM* EXTRACTS ON ANTIOXIDATION, ULTRAVIOLET  
B IRRADIATION ON RAT SKIN AND APOPTOSIS OF MCF-7, HUMAN  
BREAST CANCER CELLS THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KORAKOD  
INDRAPICHATE, Ph.D. 197 pp.

Pomegranate peel ethanolic extract (PPEE), pomegranate peel water extract (PPWE), pomegranate seed ethanolic extract (PSEE), pomegranate seed water extract (PSWE), and pomegranate juice (PJ) were studied with regards to the properties of antioxidative activity, UVB exposure prevention on rat skin and apoptosis of a human breast cell line (MCF-7). The results found that total phenolic compounds could be ranged by PPEE > PPWE > PSEE > PSWE > PJ ( $451.96 \pm 4.29$ ,  $380.54 \pm 4.29$ ,  $77.93 \pm 1.62$ ,  $51.58 \pm 0.85$  and  $2.55 \pm 0.42$   $\mu\text{g GAE/mg}$ , respectively), consistently with the flavonoids content ( $37.61 \pm 1.44$ ,  $26.05 \pm 0.93$ ,  $16.66 \pm 0.47$ ,  $10.55 \pm 0.14$  and  $0.24 \pm 0.03$   $\mu\text{g CAE/mg}$ , respectively). The median inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) which refers to the antioxidative capacity could be calculated by free radical inhibition, ferric reduction, and lipid oxidative inhibition. By which, the range from high to low was PPEE ( $121.65 \pm 2.66$ ,  $49.07 \pm 1.53$  and  $15.15 \pm 2.46$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively) > PPWE ( $151.78 \pm 2.70$ ,  $64.63 \pm 1.23$  and  $20.42 \pm 2.87$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively) > PSEE ( $1,324.35 \pm 16.89$ ,  $512.54 \pm 15.05$  and  $166.49 \pm 20.38$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively) > PSWE ( $2,577.53 \pm 44.06$ ,  $753.17 \pm 17.66$  and  $201.82 \pm 11.37$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively) > PJ ( $9,925.20 \pm 1,116.80$ ,  $4,615.94 \pm 28.90$  and  $688.87 \pm 44.03$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively). As a result, total phenolic compounds and flavonoids content of the extracts were relative to antioxidative activities. In cytotoxicity, the 50% lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) by brine shrimp lethality assay could be arranged by PPEE ( $1,206.98 \pm 12.73$   $\mu\text{g/ml}$ ) > PSWE ( $1,294.88 \pm 61.28$

$\mu\text{g/ml}$ ) > PPWE ( $1,743.31 \pm 20.17 \mu\text{g/ml}$ ) > PSEE ( $2,375.28 \pm 69.54 \mu\text{g/ml}$ ) > PJ ( $6,451.46 \pm 52.32 \mu\text{g/ml}$ ). As a result, neither total phenolic compounds nor flavonoids content correlated to cytotoxicity. Dose-response relationship of antioxidant activity and cytotoxicity which is expressed as the margin of safety (MOS) and the therapeutic index (TI) could be ranged by PPWE (125 and 11.49) > PPEE (75 and 9.92) > PSEE (5 and 1.79) > PJ (3 and 0.65) > PSWE (0.5 and 0.5). Topical application of PPEs on hairless rat skin could be against 3xMED UVB damage. This was the first discovery of PPEE and PPWE to reduce erythema (25 and 1.8 fold), to decrease the inflammatory infiltration (4.7 and 1.9 fold), to reduce epidermal thickness (1.7 and 1.6 fold), to mitigate the sunburn cells (7.4 and 7.2 fold), and to inhibit DNA fragmentation causing by UVB irradiation. In MCF-7 antiproliferative investigation via Trypan blue, MTT, and Resazurin assays, PPEE ( $347.83 \pm 11.85$ ,  $377.88 \pm 13.14$  and  $471.50 \pm 13.62 \mu\text{g/ml}$ , respectively) was more effective than PPWE ( $365.93 \pm 20.00$ ,  $459.90 \pm 15.90$  and  $589.45 \pm 16.21 \mu\text{g/ml}$ , respectively), considering on the  $\text{LC}_{50}$  at 24 hrs. DNA fragmentation and apoptotic cell morphology of MCF-7 cells were detectable. PPEs could induce antiproliferation, apoptotic cell morphology, and DNA fragmentation with dose- and time-dependent manner. The PPEs-induced apoptosis could confirm via the expression of Bcl-2, procaspase-9, procaspase-7 and PARP protein levels. In conclusion, PPEs showed the high efficacy of antioxidation, skin protection to UVB exposure, anticancer property and safety usage.

School of Biology

Academic Year 2011

Student's Signature \_\_\_\_\_

Advisor's Signature \_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature \_\_\_\_\_