

ผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญต่อเนื้อเยื่อวิทยาของตับและไตในหนูที่ได้รับสารเดกซาเมทาโซนอย่างต่อเนื่อง

Effect of Okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) Extracted on Liver and Kidney Morphology in Chronic Dexamethasone Treated-mice

สมจินตนา ท้าวทิพย์¹, วลัยพร ทองเจริญบัวงาม¹, ลดาชาติ แต่พงษ์โสรัถ¹, อาศิรา ศรีคุณ², พรรณิศา สินสวัสดิ์³, สุทธิลักษณ์ อุดมธนะทรัพย์³

Somjintana Tourtip¹, Walaiporn Tongjaroenbuangam¹, Ladachart Taepongsorat¹, Akira Srikhun², Pannida Sinsawat³, Suttuluk Udomthanacap³

Received: 29 November 2015; Accepted: 6 February 2016

บทคัดย่อ

Oxidative stress เป็นผลมาจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและระบบสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลกระทบต่อเซลล์ นำไปสู่การเกิดโรคและมีผลต่อการทำงานของตับและไต การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญ สารต้านอนุมูลอิสระ rutin และ quercetin ต่อการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของตับและไตในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดโดยการฉีด dexamethasone เข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 21 วัน โดยป้อนสารสกัดกระเจี๊ยบมอญ rutin และ quercetin ให้หนูทางปาก 3 ชั่วโมง ก่อนการฉีด dexamethasone จำนวน 60 mg/kg เมื่อครบกำหนดวันทำการไล่เลือดออกจากสัตว์ทดลอง (perfusion) ด้วย phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) และตรึงสภาพเนื้อเยื่อด้วย 4% paraformaldehyde และตามด้วยกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา ย้อมเนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ eosin ผลการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ ตับ และไตในหนูทดลองทุกกลุ่ม ความเป็นพิษต่อตับและไตพบได้ในหนูที่ได้รับ dexamethasone นอกจากนี้พบการเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญว้างขึ้น ซึ่งอาจมาจากคุณสมบัติในการขับน้ำปัสสาวะของสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญ ยังพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อตับในทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งตับมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการกำจัดสารพิษ ดังนั้นผลการทดลองที่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อตับ (เช่น การสะสมไขมันในเซลล์ตับ) ในทุกกลุ่มอาจเนื่องมาจากการตอบสนองของเนื้อเยื่อตับในการกำจัดสารพิษ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เกี่ยวกับกลไกทางสรีรวิทยาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญต่อการทำงานของไตและตับต่อไป

คำสำคัญ: okra (*Abelmoschus esculentus* Linn), histology, liver, kidney, dexamethasone

Abstract

Oxidative stress is involved in many human diseases including kidney and liver diseases. The present study using mice as models, evaluated the efficacy of okra extract, as well as rutin and quercetin, to protect against oxidative stress-induced histological changes in the kidney and liver. Stress was induced by treating mice with dexamethasone (DEX) 60 mg/kg (i.p.) for 21 days. Okra extract (Okr) and quercetin (Que) (60 mg/kg, p.o.) were administered 3 hr prior to treatment with DEX. Thereafter, the mice were perfused with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and

¹ อาจารย์, หน่วยวิจัยชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44000, E-mail: stourtip@gmail.com

² อาจารย์ผู้ช่วยสอน, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44000

³ นิสิตแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44000

¹ Lecturer, Biomedical Research Centre, Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44000

² Teaching Assistant Lecturer, Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44000

³ Student in Major of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44000

fixed with 4% paraformaldehyde. Following perfusion, histological studies were performed on paraffin sections of the liver and kidney. Histological alterations of the kidneys and livers were found in all groups. In the DEX-treated mice, liver and kidney toxicity was detected. In the okra-treated group, alteration of renal tubule diameter was detected, perhaps due to its diuretic activity. Hepatic architecture changes were also found in all groups. Since the liver plays a key role in most metabolic processes, especially detoxification, data presented here indicates that histological changes in the liver; fatty change etc., may be due to a liver detoxification system. However, elucidation of the definite physiological mechanism of the action of okra extract in the kidney and liver requires further study.

Keywords: okra (*Abelmoschus esculentus* Linn), histology, liver, kidney, dexamethasone

บทนำ

ภาวะความเครียด (Stress) ก่อให้เกิดการหลั่งฮอร์โมน glucocorticosteroids (GCs) เพิ่มมากขึ้น การได้รับ GCs ในปริมาณสูงเป็นระยะเวลาสั้น ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดของร่างกายเรื้อรัง กดภูมิคุ้มกัน และมีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อสมอง ตับ ไต และหัวใจ^{1,2} GCs ที่ทำให้เกิด oxidative stress จะชักนำให้เกิดการสะสมของ excitation amino acid (EAA) ภายนอกเซลล์ใน hippocampus ซึ่งมีรายงานพบว่า EAA มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิด neurodegenerative disease ร่วมกับภาวะ cognitive dysfunction^{3,4} ในทำนองเดียวกันพบว่า การให้ dexamethasone (DEX) ซึ่งเป็น synthetic GC receptor agonist จะชักนำให้เกิดโรค mood disorder และ psychosis^{5,6} และพบว่าหนูทดลองเมื่อได้รับ dexamethasone ในระยะเวลานานจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทใน hippocampus และยังทำให้เกิด necrotic death ของ C6 glioma cells ด้วย^{6,7} นอกจากนี้ dexamethasone ยังทำให้เกิดการสะสมของ glutamate นอกเซลล์โดยเพิ่มการหลั่ง glutamate และลดการเก็บกลับของ glutamate และเกิด up-regulation ของ glutamate receptor มากขึ้น ซึ่งภาวะนี้ทำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น dexamethasone จะถูกขนส่งเข้าเซลล์โดย P-glycoprotein ผ่านทาง ATP-dependent transporter และจะถูกนำออกจากเซลล์ด้วย สารกลุ่ม alkaloids, colchicine, antibiotics และ anthracyclines จากงานวิจัยได้มีการทดลองฉีด dexamethasone ขนาด 1 mg/kg เป็นเวลา 4 วัน พบว่าปริมาณของ P-glycoprotein ที่ไตน้อยกว่าค่าควบคุม (100%) อย่างมีนัยสำคัญ อวัยวะที่พบปริมาณของ P-glycoprotein มากกว่าค่าควบคุมอย่างมีนัยสำคัญคือ ตับ และปอด⁸ และพบว่าหนูที่ได้รับ dexamethasone ขนาด 25 mg/kg เป็นเวลา 4 วัน มีปริมาณของ P-glycoprotein เพิ่มขึ้น ร่วมกับพบการเกิด microvascular steatosis และ hepatomegaly ในตับ⁹ มีรายงานว่า Dexamethasone ยังมีผลต่อการเกิด oxidative phosphorylation ของ mitochondria ในเซลล์ตับ¹⁰ นอกจากนี้เมื่อฉีด dexamethasone ในหนูแรกเกิด

พบว่านำไปสู่การเป็นโรคไตชนิดร้ายแรงในหนูที่รอดชีวิตที่อายุ 50 สัปดาห์ และหนูที่ได้รับ dexamethasone แรกเกิด มีโอกาสรอดเพียง 83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของไต หนูที่รอดชีวิตพบว่า มี glomerulosclerosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่อายุ 32 สัปดาห์ มีการขยายของระบบท่อไต พบ lymphocytes และ macrophages เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่อายุ 14 วัน และ 32 สัปดาห์^{11,12}

การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระในร่างกาย เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์เกิดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative stress) เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ทำลายเอนไซม์ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative enzyme) และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดการตายของเซลล์¹³ และปัจจุบันการศึกษาผลของ antioxidants ที่สกัดได้จากพืช ผัก ผลไม้ เช่น carotenoids, lycopene, flavonoids และ vitamin มีประโยชน์ในการลดอันตรายของเซลล์ต่ออนุมูลอิสระ ดังนั้นการนำสารสกัดสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ที่ได้จาก แป๊ะก๊วย, เปลือกต้นสน, เมล็ดองุ่น และชาเขียว มาใช้ในป้องกันอันตรายที่เกิดจาก oxidative stress จากอนุมูลอิสระจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่นิยมกันมากขึ้น¹⁴ นักวิทยาศาสตร์จึงได้พยายามค้นหาสารใหม่เพื่อนำมาเป็นสารที่ทดแทนยาหรือการค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ตัวใหม่ที่จะนำมาใช้ทางการแพทย์ และอื่นๆ เช่น ใช้ในการรักษาโรคเมเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดแข็งตัว โรคอาการเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegenerative disease) ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และ โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) เป็นต้น

กระเจี๊ยบมอญ (Okra) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench หรือ *Hibiscus esculentus* L. เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae จีนัส *Abelmoschus* มีชื่อเรียกอื่นๆ ว่า กระเจี๊ยบเขียว มะเขือควาย มะเขือมอญ (ภาคกลาง) มะเขือพม่า มะเขือมัน มะเขือมอญ มะเขือละโว้ (ภาคเหนือ) กระเจี๊ยบมอญ มีธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามินซีสูง ให้ประโยชน์ที่สำคัญคือ มีสารขับพยาธิตัวจิ๋ว และช่วยบำรุงสมอง รักษาความดันโลหิตทั้งยังเป็นยาระบาย โดยเฉพาะเมื่อกเหนียวลื่น

ในผักกระเจี๊ยบยังมีคุณสมบัติพิเศษในการเคลือบและบรรเทาอาการระคายเคืองเนื้อเยื่อที่อักเสบ¹⁵ ดังนั้นกระเจี๊ยบมอญจึงช่วยบรรเทาอาการปวดท้องโรคกระเพาะหรือลำไส้อักเสบได้ องค์ประกอบทางเคมีของกระเจี๊ยบมอญ ประกอบไปด้วยสารในกลุ่ม flavonoid glycosides¹⁶ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ^{17,18} มีรายงานว่าพืชในวงศ์ Malvaceae จีนัส *Abelmoschus* นี้ได้ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรจีนในการต้านการอักเสบ^{19, 20, 21} นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีของ *Abelmoschus* ประกอบไปด้วยสารกลุ่ม flavonoid ชื่อว่า myricetin (3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone), gossypetin-3'-O-β-glucoside, isoquercetin, hyperoside และ quercetin-3'-glucoside^{22,23,24} สาร myricetin (3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone) มีคุณสมบัติเป็น antioxidant และ cytoprotective ต่อเซลล์มากกว่านั้นสารสกัดจาก *Abelmoschus* ยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางด้วย¹⁹ มีรายงานการใช้ myricetin ในการรักษาโรค depression และ anxiety²⁵ โรคหลอดเลือดและหัวใจ ตลอดจนลดระดับน้ำตาลในเลือด^{26,27} นอกจากนี้ยังพบว่า polysaccharide ที่พบในกระเจี๊ยบมอญ (Okra fruit rhamnogalacturonans) มีผลเพิ่มการเจริญและงอกใหม่ของเซลล์ซึ่งสามารถนำมาใช้รักษาโรคทางผิวหนัง แผลที่เกิดการหลุดลอกของ epithelial membranes ได้²⁸ ดังนั้นจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผลกระเจี๊ยบมอญ ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มของสารกลุ่ม flavonoid glycosides¹⁶ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ¹⁸ จึงน่าจะมีส่วนช่วยในการลดอันตรายของเซลล์จากอนุมูลอิสระ และภาวะ cytotoxicity ของเซลล์ได้

จากรายงานการทดลองที่ผ่านมาพบว่า กระเจี๊ยบมอญประกอบไปด้วยสารกลุ่ม flavonoids ได้แก่ quercetin, (-)-epigallo-catechin, catechin, eipicatechin, rutin, procyanidin B1 และ B2 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ¹⁷ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญสามารถช่วยลดและป้องกันการสูญเสียเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ชั้น CA3 และส่วน prefrontal cortex ช่วยเพิ่มการเรียนรู้และการจดจำ ตลอดจนมีส่วนช่วยในการป้องกันการเสียหายต่อการงอกใหม่ของเซลล์ประสาท ในหนูที่ทำให้เกิดความเครียดโดยการฉีด dexamethasone ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 21 วันได้²⁹ ดังนั้นจากผลการทดลองที่ผ่านมา กล่าวได้ว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญช่วยป้องกันและฟื้นฟูเซลล์ประสาทจากการถูกทำลายโดย dexamethasone ได้ และจากการได้รับ dexamethasone ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 21 วัน อาจส่งผลกระทบต่อตับ และไตในหนูทดลอง ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงต้องการทดสอบคุณสมบัติของ Crude extract จาก

กระเจี๊ยบมอญต่อลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของตับ และไตในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดโดยการฉีด dexamethasone ในขนาด และระยะเวลาดังกล่าว จึงน่าจะเป็นประโยชน์และเป็นความรู้พื้นฐานในการประยุกต์ใช้กระเจี๊ยบมอญเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและสมุนไพรเพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรในการวิจัยครั้งนี้ใช้หนูเมาส์ (mouse) เพศผู้ สายพันธุ์ ICR น้ำหนัก 25-30 กรัม จำนวน 40 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างสัตว์ทดลองออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว โดยผู้วิจัยได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เลขที่รับรอง: 0010/2558

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูเมาส์เพศผู้ สายพันธุ์ ICR จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล นำสัตว์ทดลองมาพักเป็นเวลา 7 วันเพื่อให้สัตว์ทดลองคลายเครียดและปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1°C ได้รับแสงสว่างและความมืดอย่างละ 12 ชั่วโมง โดยให้หนูทดลองอยู่ในกรงพลาสติกกว้าง 14.5 เซนติเมตร ยาว 24 เซนติเมตร ลึก 11.5 เซนติเมตร กรงละ 1 ตัว ปูรองพื้นด้วยขี้เลื่อยที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ และให้หนูได้รับน้ำและอาหารที่ต้องการอยู่ตลอดเวลา

การเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดความเครียด

ทำการเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดความเครียดโดยฉีด Dexamethasone ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว²⁹ เข้าทางช่องท้องในเวลา 13:00 น. ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 21 วัน และสารที่ให้โดยการป้อน มี 3 ชนิด คือ quercetin, rutin และสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญ ขนาด 60 ml/kg ของน้ำหนักตัว โดยละลายใน Propylene glycol ป้อนทางปากเวลา 10:00 น. เป็นเวลา 21 วัน

การดำเนินการทดลอง แบ่งหนูทดลองออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control) จำนวน 5 ตัว ให้ propylene glycol ขนาด 1 ml/kg ของน้ำหนักตัว โดยป้อนทางช่องปาก และฉีด normal saline ขนาด 1 ml/kg ของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม dexamethasone (DEX) จำนวน 5 ตัว ให้ propylene glycol ขนาด 1 ml/kg ของน้ำหนักตัว โดย

ป้อนทางช่องปาก และฉีด dexamethasone ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 3 กลุ่ม RD จำนวน 5 ตัว ให้ rutin ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยป้อนทางช่องปาก และฉีด dexamethasone ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่ม QD จำนวน 5 ตัว ให้ quercetin ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยป้อนทางช่องปาก และฉีด dexamethasone ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่ม KD จำนวน 5 ตัว ให้สารสกัดกระเจี๊ยบมอญ ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยป้อนทางช่องปาก และฉีด dexamethasone ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 6 กลุ่ม RS จำนวน 5 ตัว ให้ rutin ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยป้อนทางช่องปาก และฉีด normal saline ขนาด 60 ml/kg ของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 7 กลุ่ม QS จำนวน 5 ตัว ให้ quercetin ขนาด 60 mg/kg โดยป้อนทางช่องปาก และฉีด normal saline ขนาด 60 ml/kg ของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 8 กลุ่ม KS จำนวน 5 ตัว ให้สารสกัดกระเจี๊ยบมอญ ขนาด 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยป้อนทางช่องปาก และฉีด normal saline ขนาด 60 ml/kg ของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง เป็นเวลา 21 วัน เมื่อฉีด dexamethasone และป้อนสารสกัดครบ 21 วัน หนูทดลองในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งเพื่อศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาในตับ และไต

วิธีการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของตับและไต

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยทำการไล่เลือดออกจากสัตว์ทดลองแล้วฉีด 4% paraformaldehyde ที่ทำละลายใน phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) เข้าไปในเนื้อเยื่อหนูทดลองตามระบบไหลเวียนเลือด ผ่านขบวนการคงสภาพเนื้อเยื่อตัดชิ้นเนื้อในพาราฟินความหนา 3-5 μm การย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ eosin นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกผล และสรุปผลการทดลอง

นำสไลด์แก้วของเนื้อเยื่อตับ มาศึกษาและถ่ายภาพแบบสุ่ม ตัวอย่างละ 20 ตำแหน่ง โดยเลือกถ่ายภาพ hepatic lobule ที่มี central vein ตรงกลาง บริเวณรอบๆ central vein และ portal triad ในหลอดเลือดไซนัสชอยด์

สำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อไต เลือกถ่ายภาพบริเวณเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (cortex) และ ชั้นใน (medulla) ที่เป็น Juxtaglomerular apparatus คือมีทั้ง glomerulus, Bowman's capsule, renal tubule พร้อมทั้งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตแบบสุ่ม (systematic random sampling techniques) ตัวอย่างละ 20 ตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรมถ่ายภาพ digital Axio Cam ICC3 analysis system (Carl Zeiss, Germany)

สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล (Statistical analysis)

เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางท่อไตโดยใช้ Oneway Analysis of Variance (ANOVA) ตามด้วยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่โดยใช้ Post Hoc Duncan's multiple range tests ผลการทดลองแสดงเป็นค่า means \pm S.E.M.

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษาเนื้อเยื่อไตของหนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง ด้วยวิธีการย้อม hematoxylin & eosin (H&E) (Figure 1-3)

กลุ่มควบคุม (Control; Cont) glomerulus มีเยื่อบุผิวชนิด simple squamous ในทุกท่อไตมี vacuole ใน cytoplasm โดยเฉพาะท่อไตส่วนต้นพื้นผิวด้านบนพบ brush border ยื่นขึ้นมากคล้ายนิ้วมือ (finger-like surface)

กลุ่ม Dexamethasone (DEX) glomerulus มีเยื่อบุผิวชนิด simple squamous และบางบริเวณเปลี่ยนเป็น simple cuboidal epithelium ในช่วงท้ายที่จะเปิดเข้าสู่ท่อไตส่วนต้น เยื่อบุผิวของท่อไตส่วนต้นพื้นผิวด้านบนยื่นขึ้นมากคล้ายนิ้วมือ (finger-like surface) เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ พบว่ามีภาวะกระจายของการติดสีที่ไม่สม่ำเสมอ และติดสีค่อนข้างจาง เมื่อใช้กำลังขยายสูงขึ้น พบว่า หลอดเลือดขนาดเล็กทั่วไปมีการคั่งของเม็ดเลือดแดง มีการเปลี่ยนแปลงของ brush border กลายเป็นพื้นผิวยื่นยาว ออกมาคล้ายนิ้ว (finger-like) ด้านนอกติดสีเข้มกว่าด้านใน เนื่องจากมีการคั่งของเลือดที่ cortex มากกว่า medulla ส่วนของท่อไตส่วนปลายจะติดสีจางลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และ ผนังด้านบนของเยื่อบุผิวของท่อไตส่วน collecting tube มีการนูนออกมาคล้ายถุง (bleb) cytoplasm ติดสีแดงมากกว่าเซลล์

กลุ่ม Okra และ Saline (KS) (Figure 1C) พบ glomerulus มีเยื่อบุผิวชนิด simple squamous และบางบริเวณเปลี่ยนเป็นชนิด simple cuboidal ตั้งแต่ผนังที่ชิดขอบด้านซ้าย tubule เยื่อหุ้ม Bowman's capsule มีขนาดโตขึ้นจน

เป็น simple cuboidal epithelium ครบวง ในบาง Juxtaglomerular apparatus (JGA) เซลล์บุท่อไตเกือบทุกส่วนมีการเปลี่ยนแปลง พบมากที่สุดคือ ท่อไตส่วนต้น ไม่พบ brush border, cytoplasm ตืดสีแดงเข้มและจาง ไม่สม่ำเสมอ เยื่อบุผิวของท่อส่วนต้นเป็น finger-like surface หลอดเลือดแดงขนาดเล็กขยายตัว พบถุงน้ำ ทางด้านบนของเซลล์ บางเซลล์บุท่อไตส่วนต้น ส่วนปลาย และ Henle's loop โดยรวมเซลล์บุท่อไตมีการเปลี่ยนแปลงของการตืดสีที่เข้มและจางไม่สม่ำเสมอ ผนังเซลล์ด้านบนมีการยื่นคล้ายถุงน้ำ

กลุ่ม Okra และ Dexamethasone (KD) (Figure 1D) glomerulus มีเยื่อบุผิวชนิด simple cuboid Bowman's capsule บางบริเวณเปลี่ยนชนิดเยื่อบุผิวเป็น simple cuboidal ในช่วงท้ายที่จะเปิดเข้าสู่ท่อไตส่วนต้น และเยื่อบุผิวของท่อส่วนต้นเป็น finger-like surface เซลล์ท่อไตส่วนมากตืดสีแดงมากกว่ากลุ่มอื่น เนื้อเยื่อโดยรวมตืดสีไม่เท่ากันของท่อไตส่วนต้น เซลล์ที่ตืดสีแดงเข้มจะพบได้น้อยกว่าเซลล์ที่ตืดสีจางในท่อระนาบเดียวกันและอยู่เป็นกลุ่ม (Cluster) เซลล์ด้านบนยังคงพบ brush border แต่น้อยลง พื้นผิวด้านบนยื่นขึ้นมาคล้ายนิ้วมือ (finger-like surface), ท่อไตส่วนปลาย, collecting tube, Henle's loop เซลล์ตืดสีจางลงตามลำดับ และยังพบ vacuole ในไซโตพลาสซึมของเซลล์บุท่อไต ท่อไตทุกส่วนมีลักษณะปกติ ท่อไตส่วนต้น ขอบเขตเซลล์ของ ท่อไตส่วนปลาย ไม่ชัดเจน นิวเคลียสตืดสีน้ำเงินเข้ม

กลุ่ม Quercetin และ Saline (QS) (Figure 1E) พบ Bowman's capsule หนาผิดปกติในส่วนปลายที่ต่อกับท่อไตส่วนต้น และยังมี การบวมคล้ายถุงน้ำของเซลล์บุท่อไต เซลล์มีการตืดสีไม่สม่ำเสมอ เมื่อใช้กำลังขยายสูงขึ้นพบว่าบริเวณที่ตืดสีเข้มมีการเน่าตายของเซลล์ (necrosis) นิวเคลียสโปร่ง

ตืดสีจาง ไม่พบ nucleous condensation ภายในไซโตพลาสซึม ตืดสีแดงเข้ม ขอบเขตเซลล์ไม่ชัดเจน บางเซลล์หลุดเข้ามาในช่องว่าง ร่วมกับพบ พลาสมา cell ด้วย โดยทั่วไปเซลล์บุท่อไตมีรูปร่างเรียวยาว ค่อนข้างกระสวย แสดงการเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดการอักเสบ

กลุ่ม Quercetin และ Dexamethasone (QD) (Figure 1F) พบการย้อมตืดสีของ lipofuscin pigment ในหลอดเลือดแดงและดำ ร่วมกับใน glomerulus เนื่องจากมีการแตกของเม็ดเลือดแดง และในเซลล์บุท่อไตส่วนต้น เซลล์ตืดสีแดงเข้มคล้ายเซลล์ปกติ แต่ไม่พบ brush border บริเวณ collecting tube มีเซลล์บวมตืดสีแดงเข้ม cytoplasm ของท่อไตส่วนต้นพบการสะสมของสารเหลวใน vacuole มากกว่าบริเวณอื่น ขอบเขตของเซลล์บุท่อไตไม่ชัดเจน และเซลล์บุท่อไตของ Henle's loop บวม

กลุ่ม Rutin และ Saline (RS) (Figure 1G) พบว่า Bowman's capsule หนาผิดปกติในส่วนปลายที่จะต่อกับท่อไตส่วนต้น และมีพื้นผิวด้านบนยื่นยาว พบเลือดคั่งที่หลอดเลือดแดงขนาดเล็ก การตืดสีของทุกเซลล์บุผิวน้อยกว่าทุกกลุ่ม การทดลอง ท่อไตส่วนต้นมีการเปลี่ยนแปลงพบ brush border ลดลงและเปลี่ยนไปเป็น finger-like พบการบวมของเซลล์บุท่อไตเกือบทั้งหมด

กลุ่ม Rutin และ Dexamethasone (RD) (Figure 1H) พบการบวมของเซลล์โดยทั่วไป ท่อไตส่วนต้นไม่พบ brush border และตืดสีแดงเข้ม collecting tube มีเซลล์บวมและหลุดเข้ามาใน lumen และที่ collecting duct พบ bleb ด้านบนของเซลล์มากกว่าท่อไตส่วนอื่นๆ

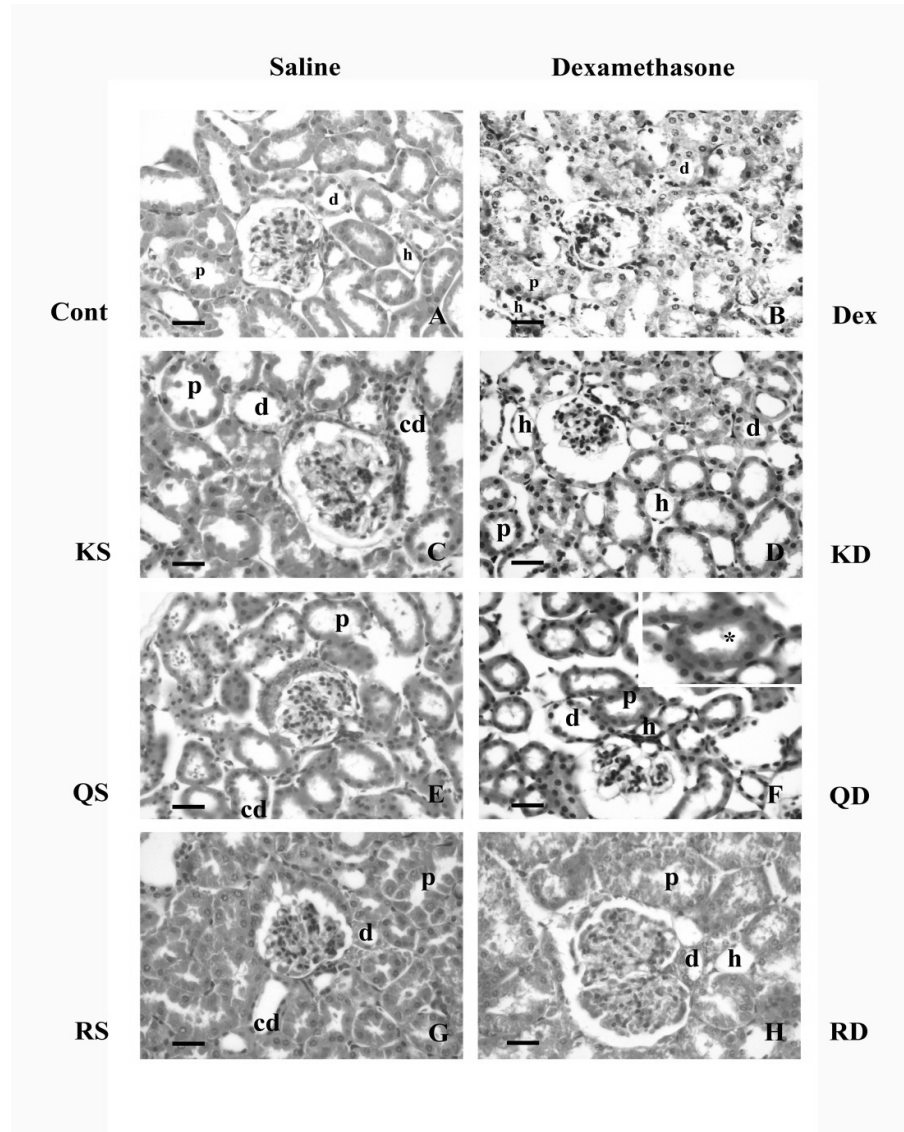


Figure 1 Micrographs comparing H&E-stained sections (3-5 μm thick) of mice kidneys treated with normal sterile saline (left) and dexamethasone (right). (A) Control mice, bar 20 μm ; (B) DEX mice showing tissue damage (*), bar 50 μm ; (C) KS mice, bar 20 μm ; (D) KD mice; (E) QS mice, bar 20 μm ; (F) QD mice showing, bar 20 μm ; (G) RS mice, bar 20 μm ; (H) RD mice, bar 20 μm (c: collecting tubule; cd: collecting duct; Cont: Control; d: distal tubule; DEX: Dexamethasone; h: Henle's loop; KS: Okra+saline; p: proximal tubule; QS: Quercetin+Saline; RS: Rutin+Saline; QD: Quercetin+Dexamethasone; RD: Rutin+Dexamethasone; KD: Okra+Dexamethasone).

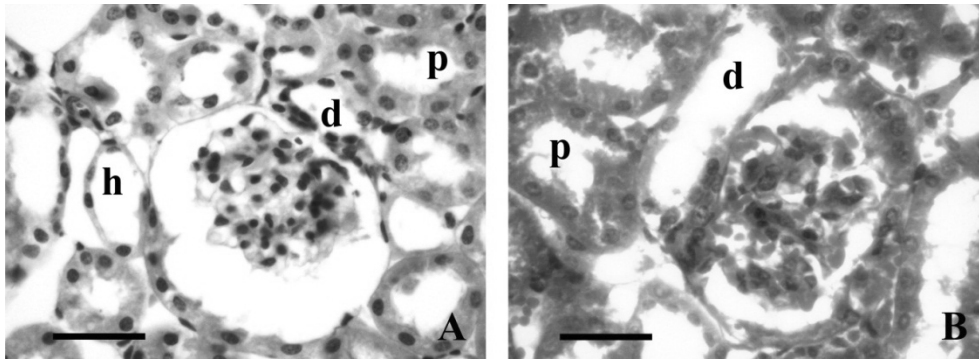


Figure 2 Micrographs comparing H&E-stained sections (3-5 μm thick) of specimens from KD and DEX mice. (A) KD mice, bar 20 μm (B) DEX mice, bar 50 μm (c: collecting tubule; d: distal tubule; h: Henle's loop; p: proximal tubule).

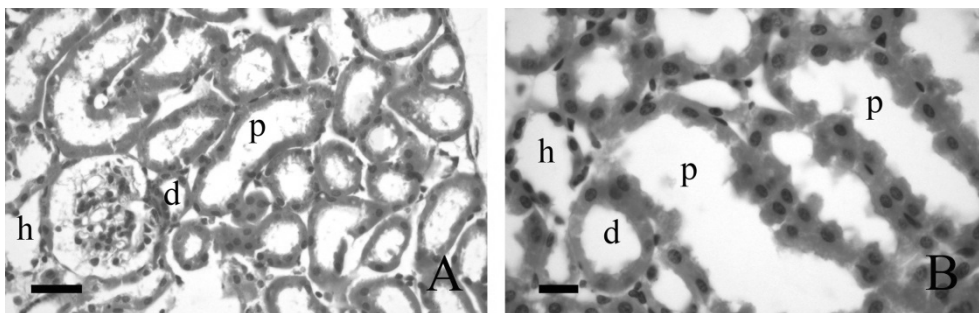


Figure 3 Micrographs comparing H&E-stained sections (3-5 μm thick) of specimens from Control and KS mice. (A) Control mice; (B) KS mice (d: distal tubule; p: proximal tubule, bar 20 μm).

2. ผลการเปลี่ยนแปลงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตของหนูภายหลังจากได้รับ dexamethasone และ/หรือ quercetin, rutin และสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญ (okra) (Table 1)

ขนาดของท่อไตส่วนต้น diameter (μm) หนูกลุ่ม QS และ RS มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนต้นไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับ Okra เพียงอย่างเดียว (KS) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนต้นมากกว่ากลุ่ม Control, QS และ RS อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ในขณะที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนต้นของหนูกลุ่ม Dex ไม่มีความแตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม, QD, RD และ KD สังเกตว่าท่อไตส่วนต้น diameter ของหนูกลุ่มที่ได้รับ Okra เพียงอย่างเดียวที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนต้นมากขึ้น ในขณะที่กลุ่มอื่นๆขนาดของท่อไตส่วนต้นไม่มีความแตกต่างกัน (Figure 4) ขนาดของท่อไตส่วนปลาย diameter (μm) หนูกลุ่ม QS และ RS มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่ม KS มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายมากกว่ากลุ่มควบคุม, QS, RS อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ในขณะที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายของหนูกลุ่ม Dex ไม่มีความแตกต่างจากหนูกลุ่ม Cont, QD, RD และ KD โดยที่ระหว่างกลุ่ม QD, RD และ KD ไม่มีความแตกต่าง ส่วนกลุ่ม RD มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายมากกว่ากลุ่ม okra ร่วมกับ dexamethasone (KD) อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายของ QD มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายมากกว่ากลุ่ม QS อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายของ RD มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายมากกว่ากลุ่ม RS อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายของ KD มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายน้อยกว่ากลุ่ม KS อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

หนูกลุ่ม KS ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากหนูกลุ่มที่ได้รับ dexamethasone และกลุ่มที่ได้รับ quercetin หรือ rutin ร่วมกับ dexamethasone (Dex, QD และ RD) โดยสังเกตว่าท่อไตส่วนปลาย diameter ของหนูกลุ่ม Dex, KS, QD และ RD มีแนวโน้มกว้างขึ้น กลุ่ม QS มีขนาดความกว้าง

ของท่อไตส่วนที่สั้นที่สุดในขณะที่กลุ่มอื่นๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วนปลายไม่มีความแตกต่างกัน

ขนาดของ Henle's loop diameter (µm) หนูกลุ่ม QS, RS, KS และ D มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Henle's loop ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม และระหว่างกลุ่มก็ไม่มีมีความแตกต่างกัน และพบว่ากลุ่ม QD เพียงกลุ่มเดียวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Henle's loop มากกว่ากลุ่ม QS อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

หนูกลุ่มที่ได้รับ quercetin เพียงอย่างเดียวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วน Henle's loop น้อยที่สุด สังเกตว่ากลุ่ม QS มีขนาดความกว้างของท่อไตส่วนที่สั้นที่สุด และแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ dexamethasone (Dex) และในหนูกลุ่มที่ได้รับ quercetin ร่วมกับ dexamethasone (QD) ในขณะที่กลุ่มอื่นๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Henle's loop ไม่มีความแตกต่างกัน

ขนาดของ collecting duct diameter (µm) หนูกลุ่ม QS, RS และ D มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ collecting duct ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่ม KS มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ collecting duct มากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ระหว่างกลุ่ม QS และ QD ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่กลุ่ม RD และ KD มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ collecting duct มากกว่ากลุ่ม RS และ KS ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

หนูกลุ่มที่ได้รับ rutin เพียงอย่างเดียวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตส่วน collecting duct น้อยที่สุด และแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ dexamethasone (DEX) และในหนูกลุ่มที่ได้รับ rutin ร่วมกับ dexamethasone (RD) อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ในขณะที่กลุ่มอื่นๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ collecting duct ไม่มีความแตกต่างกัน

Table 1 The diameter of the renal tubules of mice kidneys in different groups.

Mice	Cont	DEX	KS	QS	RS	QD	RD	KD
Proximal tubule	15.60±0.71	16.89±1.24	18.88±0.62	15.63±0.48	13.93±0.78	16.44±0.80	16.58±0.72	16.02±0.62
Distal tubule	14.26±0.84	15.13±0.68	17.37±0.90	11.99±0.84	14.04±1.06	15.97±0.54	16.52±0.60	13.53±0.65
Henle's loop	13.39±1.08	18.04±3.08	15.91±0.70	12.09±1.18	13.78±0.87	18.59±1.20	17.18±1.12	14.05±0.95
Collecting duct	16.62±1.12	17.16±1.24	18.52±0.64	15.38±0.84	13.83±0.82	14.95±0.83	17.24±0.88	14.79±0.86

3. การศึกษาเนื้อเยื่อตับของหนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ด้วยวิธีการย้อม hematoxilin & eosin (H&E) (Figure 4-7)

กลุ่ม Control เป็นกลุ่มหนูที่ได้รับ propylene glycol และ 0.9% saline พบว่าเซลล์ตับมีรูปร่างหลายเหลี่ยม บวม พบ 1-2 nuclei/เซลล์ตับ ใน nucleus ยังพบ nucleolus เรียงตัวเป็นแถวเดี่ยว (single cord) บาง cytoplasm ของเซลล์มี ถุงเล็ก ๆ ภายในเซลล์ มีการสะสมของสารในรูปของ vacuole และ ไชนัสซอยด์ มีช่องว่าง พบ kupffer cells ไม่พบการเน่าตายของเซลล์ ไชโตพลาสติดสีแดงมากกว่าปกติ และ ไชนัสซอยด์ตีบแคบ

กลุ่ม Okra และ Saline (KS) เป็นกลุ่มหนูที่ได้รับ okra ที่ละลายใน propylene glycol และ 0.9% saline พบว่าเซลล์ตับบริเวณรอบ central vein และ portal triad มีการติดสีน้อย และมี vacuole ใน cytoplasm เซลล์รูปร่างยาวเรียวย มีการสะสมของเม็ดเลือดขาวเป็นกลุ่ม (lymphocyte aggrega-

tion) บางเซลล์เปลี่ยนรูปร่างยาวรี (fusiform) ไชโตพลาสติดสีน้ำเงินจาง (basophilic)

กลุ่ม Rutin และ Saline (RS) เป็นกลุ่มหนูที่ได้รับ rutin ที่ละลายใน propylene glycol และ 0.9% saline พบว่าเซลล์ตับส่วนมากมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็ก (cuboidal shape) หลุดจากเยื่อฐานเซลล์ ใน cytoplasm มีการสะสมของของเหลวในถุง ขนาดของ ไชนัสซอยด์กว้างประมาณ แต่มีเม็ดเลือดแดงสะสมอยู่ทั่วไป สังเกตเห็น Kupffer cell และ lymphocyte อยู่ในเนื้อเยื่อตับ มีการติดสีไม่สม่ำเสมอ รอบๆ central vein พบว่าติดสีแดงมากกว่าที่อื่น และเซลล์มี vacuole มากกว่าที่อื่น ไชโตพลาสติดสีแดง และพบถุงขนาดเล็กกระจายทั่วไป เซลล์ตับไม่เรียงตัวเป็น single cord

กลุ่ม Quercetin และ Saline (QS) เป็นกลุ่มหนูที่ได้รับ quercetin ที่ละลายใน propylene glycol และ 0.9% saline พบเซลล์ตับรูปร่างหลายเหลี่ยม หลุดจากเยื่อฐานเซลล์ เซลล์ตับมีการติดสีสม่ำเสมอ บางกลุ่มของเซลล์ตีบ

มีขนาดเล็กติดสีเข้ม พบมี vacuole ใน cytoplasm เล็กน้อย เซลล์เรียงกระจายทั่วไป ไฮโดรพลาสมาติดสีแดงมาก ไซโทซอइटไม่ชัดเจน

กลุ่ม Dexamethasone (Dex) เป็นกลุ่มหนูที่ได้ รับ propylene glycol และ dexamethasone พบว่าการเรียงตัวของเซลล์ตั้งเป็นแบบ single cord บางพื้นที่พบเซลล์อัดแน่นมากเบียด ไซโทซอइटตั้งแคบลง พบว่ามี 1-2 nuclei บางเซลล์เกิด vacuole เบียดจนขีดนิวเคลียส บริเวณรอบ central vein (pericentral zone) มีการเปลี่ยนแปลงของ endothelial cell มีขนาดใหญ่ขึ้นคล้าย fibroblast เซลล์ตั้งบวม มีถุงขนาดเล็กภายในเซลล์มารอบ central vein รูปร่างของเซลล์มีขนาดแตกต่างกันมาก ไฮโดรพลาสมาติดสีแดงมากเป็นบางกลุ่ม

กลุ่ม Okra และ Dexamethasone (KD) เป็นกลุ่มหนูที่ได้รับ okra ที่ละลายใน propylene glycol และ dexamethasone พบว่าเซลล์ตั้งใกล้ central vein เปลี่ยนรูปร่างเป็นยาวรี (fusiform) เรียงตัวเป็น single cord พบ vacuole ใน cytoplasm ส่วนช่องว่างของ central vein แคบลง กลุ่มเซลล์ตั้งที่ห่างออกไปจะมีถุงขนาดเล็กภายในเซลล์มากกว่า เซลล์ตั้งที่ใกล้ central vein ไฮโดรพลาสมาติดสีน้ำเงินจาง (basophilic)

กลุ่ม Rutin และ Dexamethasone (RD) เป็นกลุ่มหนูที่ได้รับ rutin ที่ละลายใน propylene glycol และ dexamethasone พบว่าเซลล์ตั้งมีรูปร่างหลายเหลี่ยมบวม หลุดจากเยื่อฐานเซลล์ ไซโทซอइटตั้งแคบ รอบ portal triad มี fibroblast มาก ไฮโดรพลาสมาติดสีแดงมาก และพบถุงขนาดเล็กกระจายทั่วไป ไซโทซอइटไม่ชัดเจน

กลุ่ม Quercetin และ Dexamethasone (QD) เป็นกลุ่มหนูที่ได้รับ quercetin ที่ละลายใน propylene glycol และ dexamethasone พบว่าเซลล์ตั้งมีรูปร่างหลายเหลี่ยม หลุดจากเยื่อฐานเซลล์ ไซโทซอइटตั้งแคบ รอบ portal triad มี fibroblast มากกว่าที่อื่น ไฮโดรพลาสมาติดสีแดง และพบถุงขนาดเล็กกระจายทั่วไป ไซโทซอइटไม่ชัดเจน

วิจารณ์และสรุปผล

จากผลการทดลองพบว่า หนูทุกกลุ่มมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของตับ และไต การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเนื่องมาจากการได้รับสารต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน ซึ่งตับ และไต ทำหน้าที่ในการขับสารต่างๆ ที่ร่างกายดูดซึมเข้าไป จากการศึกษานี้พบว่าปริมาณออกฤทธิ์ หรือชีวประสิทธิผล (bioavailability) ของ quercetin และ rutin ในหนู rats พบว่า quercetin จะถูกดูดซึมได้เร็วและดีกว่า rutin ที่ลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ภายหลังจากการให้ rutin เข้าไป 12-24 ชั่วโมง

rutin จะถูกเติมน้ำแล้วเปลี่ยนเป็น quercetin และดูดซึมในลำไส้ใหญ่ (cecum)³⁰ เมื่อ quercetin metabolite แล้วจะจับกับ albumin ใน พลาสมา ซึ่งจะถูกขับออกจากร่างกายช้าลง จึงทำให้ quercetin สามารถอยู่ในพลาสมา ได้นานถึง 24 ชั่วโมง quercetin และ rutin จะถูกขับออกจากร่างกายทาง bile และทาง urine^{31,32} นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาเมแทบอลิซึมของสารกลุ่ม flavonoids อาศัยการทำงานของเนื้อเยื่อของลำไส้เล็ก ตับ และไต โดย flavonoid ที่ไม่ดูดซึมในลำไส้เล็ก และถูกดูดซึมแล้วจะถูกขับออกทาง bile แล้วส่งต่อไปยังลำไส้ใหญ่เพื่อขับออกต่อไป และที่ไตจะมีเอนไซม์ ที่สามารถเปลี่ยนรูปแบบโครงสร้าง (biotransformation) โดยตรวจพบ flavonoids ในรูปแบบ conjugate form³²

Dexamethasone มีผลต่อการทำงานของท่อไตส่วน medullary thick ascending limb of the loop of Henle, distal convoluted tubule, cortical และ medullary collecting tubule³³ โดยพบว่ามี Corticosteroid-binding proteins receptors ในไต ประกอบด้วย mineralocorticoid-specific (Type I), glucocorticoid-specific (Type II), และ corticosterone-specific (Type III) site ซึ่ง receptors นี้มีหน้าที่กระตุ้น renal Na-K-ATPase³⁴ และเมื่อให้ dexamethasone ในระยะสั้นแก่หนูที่ตั้งท้องพบว่า ภายหลังคลอดลูกหนูมีความดันเลือดเพิ่มขึ้น และพบว่ามีการทำลายของไต โดยมีจำนวนของ glomerular ลดลงถึงร้อยละ 20 เมื่อให้ dexamethasone แก่หนูในวันที่ 15 ของการตั้งท้อง³⁵ และนอกจากนี้หากแม่หนูได้รับ dexamethasone ตลอดระยะเวลาของการตั้งครรภ์ พบว่าลูกที่คลอดออกมาเมื่อมีอายุ 60 วัน มีภาวะความดันโลหิตตัวบนสูงขึ้น ร่วมกับจำนวนของ nephron ลดลงถึงร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม³⁵ ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานพบว่า glucocorticoid ทำลายการเจริญของไตส่วนนอกของเมตัสลา และกระตุ้นให้ loop of Henle แบ่งตัวเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีผลต่อปริมาณความเข้มข้นของปัสสาวะในหนู rat³⁶ และเมื่อให้ dexamethasone ในหนูแรกเกิด ทำให้เกิดการอักเสบในไต กระตุ้นให้เกิด persistent pro-fibrotic process จึงทำให้หนูมีอาการไตวายจากเนื้อไตได้รับภัยอันตราย ทำให้ตายในเวลาต่อมา³⁷ มีรายงานการศึกษาในหนู mice ที่ได้รับ dexamethasone (0.5 mg/kg) ป้อนทางปากเป็นระยะเวลา 23 วัน ทำให้เกิดมีโปรตีนในปัสสาวะและมีลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของไต ดังนี้คือ mild mesangial expansion, segmental or global hyalinosis/sclerosis ในชั้น deep cortical glomeruli มีการเปลี่ยนแปลงเฉพาะที่ของท่อไต โดยพบช่องว่างในเซลล์ท่อไต³⁸ ดังนั้นการที่หนูได้รับ dexamethasone เป็นระยะเวลาสั้นจะเพิ่มการอักเสบของเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย การเปลี่ยนแปลงของเซลล์บุผิวของ

ท่อไตส่วนต้นมีผนังด้านบนยื่นคล้ายนิ้วและมีถุงน้ำในไซโตพลาสซึม เนื่องจากค่าของ osmotic nephrosis ที่ต่างกันภายในท่อไตฝอยและเซลล์บุท่อไต ส่งผลให้เกิดการสร้างถุงน้ำ (vacuolization) ในเซลล์บุผิวท่อไตมากขึ้น จากการสังเกตพบว่ามีการขยายตัวของหลอดเลือด (congestion) ในกลุ่มทดลองที่ได้รับ Dexamethasone มากกว่ากลุ่มอื่น และจากข้อมูลเปรียบเทียบขนาดของท่อไตส่วนต้น สรุปว่าขนาดของท่อไตในกลุ่ม Dex, QD, RD, KD และ KD มีแนวโน้มจะกว้างขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการปริมาณเลือดเข้าสู่ไต (Blood flow) (Table 1)

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า ความกว้างของท่อไตส่วนต้นและส่วนปลายกว้างขึ้น แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจเกิดจากการลดการดูดกลับของปัสสาวะหรือมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะเป็นเวลานานได้^{39, 40} กระเจี๊ยบมอญมี anthocyanidin, procyanidin B1, B2, quercetin และ rutin เป็นองค์ประกอบ⁴¹ ซึ่ง cyanidin มีความสามารถในการดูดกลับของ Na^+ , Cl^- และน้ำ โดยทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง ACE (angiotensin converting enzyme)⁴¹ จึงทำให้มีการดูดกลับของ Na^+ และน้ำได้น้อย การขับออกของน้ำปัสสาวะที่เพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้มีการขยายของท่อไตส่วนต้นและส่วนปลายได้ และยังพบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญนั้นอาจมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะได้เช่นเดียวกับกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Memispermaceae เช่นเดียวกัน⁴³ นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยพบว่า quercetin และ rutin สามารถลดความดันเลือดได้ และมีฤทธิ์ขับปัสสาวะ⁴⁴ ดังนั้นการได้รับ quercetin, rutin (ซึ่งเปลี่ยนเป็น quercetin ในเวลาต่อมา) และ สารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญ จึงอาจส่งผลต่อการทำงานของไต โดยพบเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไต และลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยผลการทดลองของหนูกลุ่มที่ได้รับ Okra พบว่าเซลล์บุผิวของท่อไตส่วนต้นเปลี่ยนแปลง แต่ที่พบมากที่สุดคือหนูกลุ่ม KS ในขณะที่ความกว้างของท่อไตมีขนาดใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะการขับสาร quercetin และ rutin จะถูกขับออกจากร่างกายทางน้ำดีและน้ำปัสสาวะ^{31, 32} ซึ่งสารทั้งสองพบในสารสกัดจากกระเจี๊ยบมอญ ส่งผลให้เกิดการปรับตัวของเซลล์ต่อความเข้มข้นสารกลุ่มนี้ที่ท่อไตส่วนต้นมากกว่าเซลล์บุท่อไตส่วนอื่น แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของ Okra อย่างละเอียดในประเด็นนี้ ทางผู้วิจัยเห็นว่าควรทำการศึกษาต่อไป

มีรายงานว่า การได้รับ Endogenous substances เช่น glucocorticoids และ exogenous substances เช่น xenobiotics จะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่ม P450 (CYP) เอนไซม์ ในตับ ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ตับ เกิด hepatic toxicity และ necrosis⁴⁵ และ

dexamethasone ยังมีผลต่อการเกิด oxidative phosphorylation ของ mitochondria ในเซลล์ตับ¹⁰ นอกจากนี้มีรายงานว่า quercetin ทำให้ hepatocytoma cell line (HepG2) เกิด apoptosis โดยกระตุ้น caspase 3, caspase 9, ลด Bcl-2 family และผลข้างเคียงของการได้รับสารสกัดจากพืชสมุนไพรเป็นพิษต่อร่างกายมีความสัมพันธ์กับปริมาณที่ใช้ และระยะเวลาที่ให้⁴⁶ ดังนั้นจากผลการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของตับจึงเห็นการเปลี่ยนแปลงในทุกกลุ่ม โดยเฉพาะหนูกลุ่ม KS พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับที่สะสมสารน้ำเป็นถุง (vacuolization) ในไซโตพลาสซึม รอบ central vein และการย้อมสีจะชัดจางกว่าบริเวณอื่นอย่างชัดเจน ส่วนเซลล์ตับรอบ portal triad เซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์รูปร่างเรียวยาวจากการตอบสนองต่อการได้รับบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) และมีการสร้างถุงน้ำในไซโตพลาสซึมเช่นกัน จากการที่เซลล์ตับรอบ central vein มีการทำลายสารพิษต่างๆ มากกว่าเซลล์บริเวณอื่น ซึ่งอาจเป็นเพราะเซลล์ตับบริเวณนี้ ทำหน้าที่กำจัดสารและเก็บไว้ในรูปสารละลายในน้ำได้มากกว่ากลุ่มเซลล์ที่อยู่รอบ portal triad นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดจากเมล็ดของกระเจี๊ยบมอญมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี^{47, 48} ซึ่งเมื่อป้อนสารสกัดในปริมาณ 200 mg/kg ของน้ำหนักตัว เป็นระยะเวลา 7 วัน สามารถฟื้นฟูการเรียนรู้และจดจำในหนูทดลองที่ได้รับ scopolamine ได้⁴⁷ และสามารถป้องกันภาวะ oxidative stress ของ hepatocyte จากการได้รับ carbon tetrachloride ได้⁴⁸ นอกจากนี้ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดกระเจี๊ยบมอญพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณการป้อนของสารสกัดจากเมล็ดกระเจี๊ยบมอญให้หนูในปริมาณ 2000 mg/kg ของน้ำหนักตัว ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของตับ ความเป็นพิษ และไม่ทำให้หนูตาย⁴⁷ ตลอดจนไม่พบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ตับจากการเพาะเนื้อเยื่อตับหนูด้วย⁴⁸ แต่ผลที่ตับต้องทำหน้าที่ในการกำจัดพิษของสารนี้ โดยทำยังต้องศึกษาเพิ่มเติมในการตรวจระดับเอนไซม์ต่างๆ ของตับต่อไป จากข้อมูลงานวิจัยในครั้งนี้มีเพียงข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาของไต และ ตับ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการทำงานของตับ และไตในเชิงของสรีรวิทยาในครั้งต่อไป เพื่อนำสมุนไพรมาใช้ด้วยความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพมากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนส่งเสริมและพัฒนางานวิจัยของบุคคลากรและนิสิต หน่วยวิจัยชีวเวชศาสตร์ จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

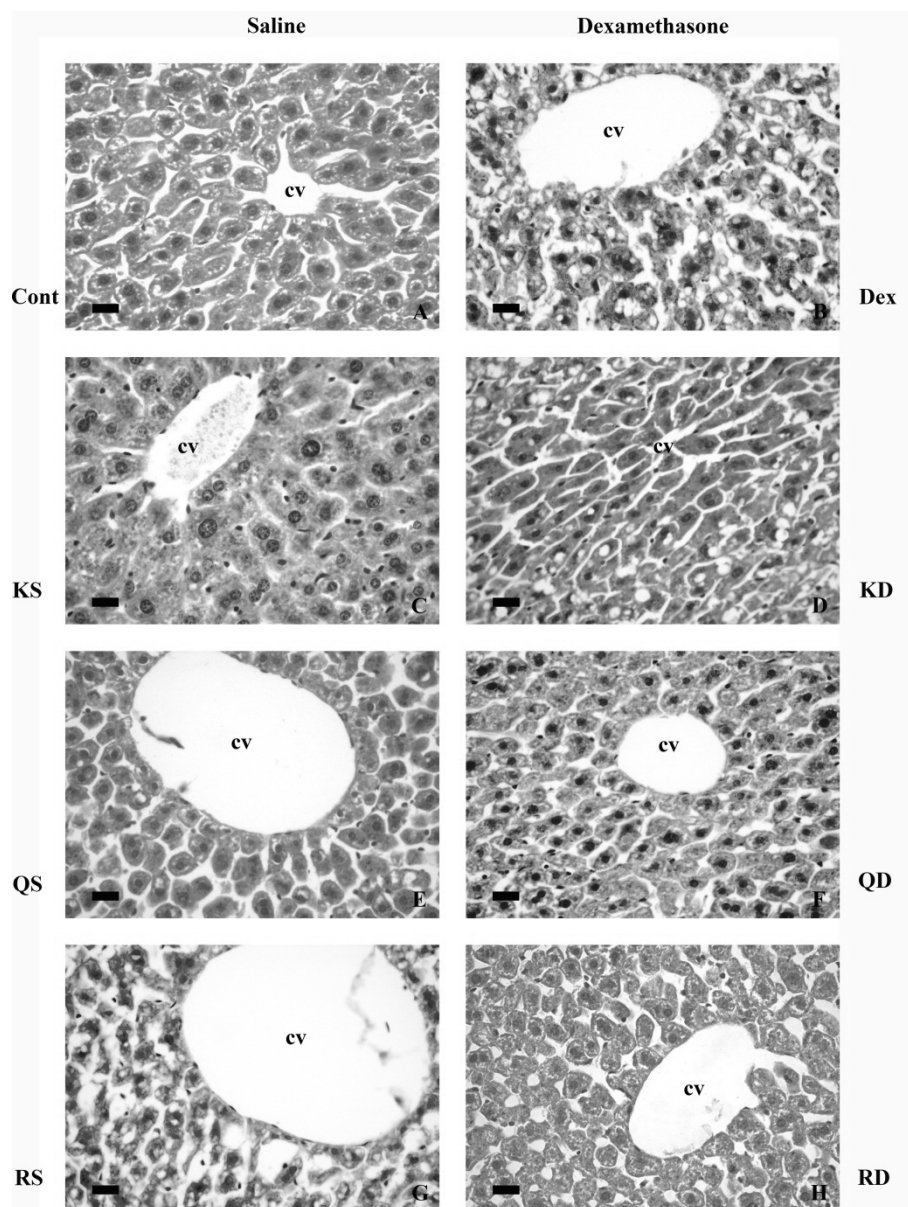


Figure 4 Micrographs comparing H&E-stained sections (3-5 μm thick) of the central vein of mice livers treated with normal sterile saline (left) and dexamethasone (right). (A) Control mice; (B) Dex mice showing the macrovascular body in a hepatocyte surrounding the central vein; (C) KS mice showing fusiform hepatocytes; (D) KD mice showing narrowing of the central vein and fusiform hepatocytes; (E) QS mice showing damage to the basement membrane and acidophilic cytoplasm; (F) QD mice showing the damage to the hepatocyte and acidophilic cytoplasm; (G) RS mice showing damage of the hepatocytes, acidophilic cytoplasm and hepatocyte bleb; (H) RD mice showing hepatocyte bleb, edema, pv: portal vein cytoplasm; also the sinusoid is not clear. (Cont: Control; cv: central vein; Dex: Dexamethasone; KD: Okra+Dexamethasone; KS: Okra+Saline; QD: Quercetin+Dexamethasone; QS: Quercetin+Saline; RD: Rutin+Dexamethasone; RS: Rutin+Saline; bar 20 μm).

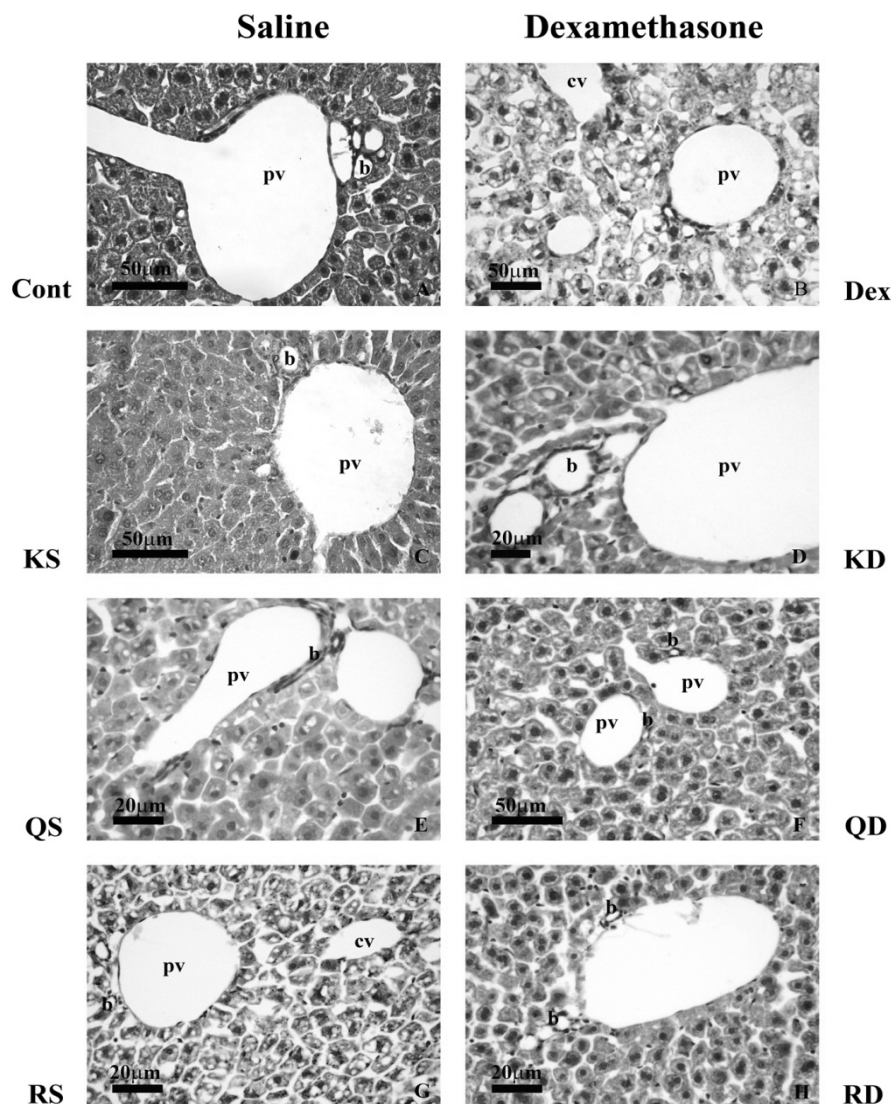


Figure 5 Micrographs comparing H&E-stained sections (3-5 µm thick) of the portal vein of mice livers treated with normal sterile saline (left) and dexamethasone (right). (A) Control mice, bar 50 µm; (B) Dex mice, hepatocyte showing bleb, irregular shape, dark nucleus, pale cytoplasm and cell edema, bar 50 µm; (C) KS mice, hepatocyte showing fusiform shape and acidophilic cytoplasm, bar 50 µm; (D) KD mice, hepatocyte showing fusiform shape and pale basophilic cytoplasm, bar 20 µm; (E) QS mice, hepatocyte was removed from the basement membrane, acidophilic cytoplasm, bar 20 µm; (F) QD mice, hepatocyte was removed from the basement membrane, bleb formation, acidophilic cytoplasm and narrow sinusoid, bar 50 µm; (G) RS mice, small hepatocytes throughout sample, loss of the hepatocytes from basement membrane, disappearance of a single cord, bar 20 µm; (H) RD mice, showing edema, acidophilic cytoplasm, also the sinusoid is not clear, bar 20 µm. (Cont: Control; cv: central vein; b: bile duct; Dex: Dexamethasone; KD: Okra+Dexamethasone; KS: Okra+Saline; pv: portal vein; QD: Quercetin+Dexamethasone; QS: Quercetin+Saline; RD: Rutin+Dexamethasone; RS: Rutin+Saline).

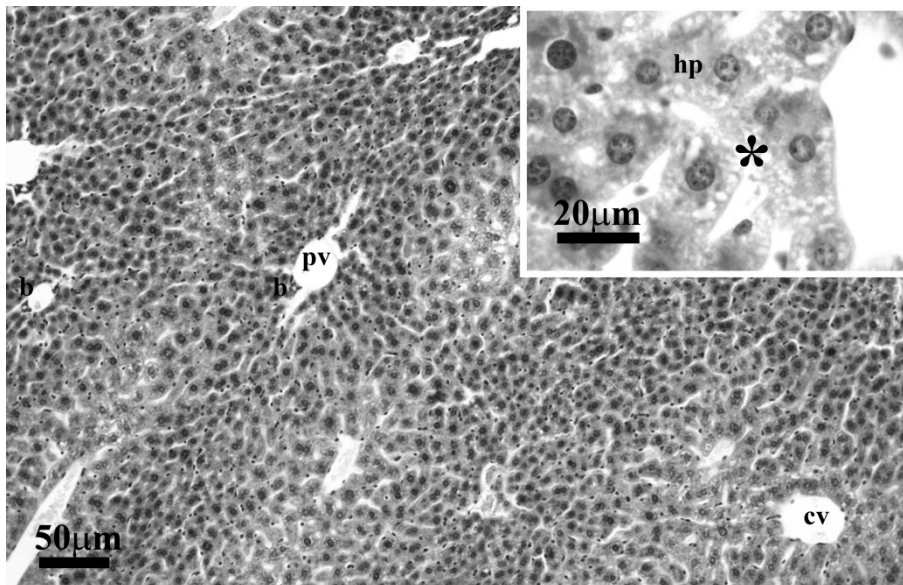


Figure 6 Micrograph of sectioned (3-5 μm thick) and H&E stained tissue surrounding the portal vein of mice livers (KS), bar 100 μm . The hepatocytes have many small vacuoles in their cytoplasm. The hepatic cord and sinusoid (*) are labeled, bar 50 μm . (b: bile duct; hp: hepatocyte; pv: portal vein).

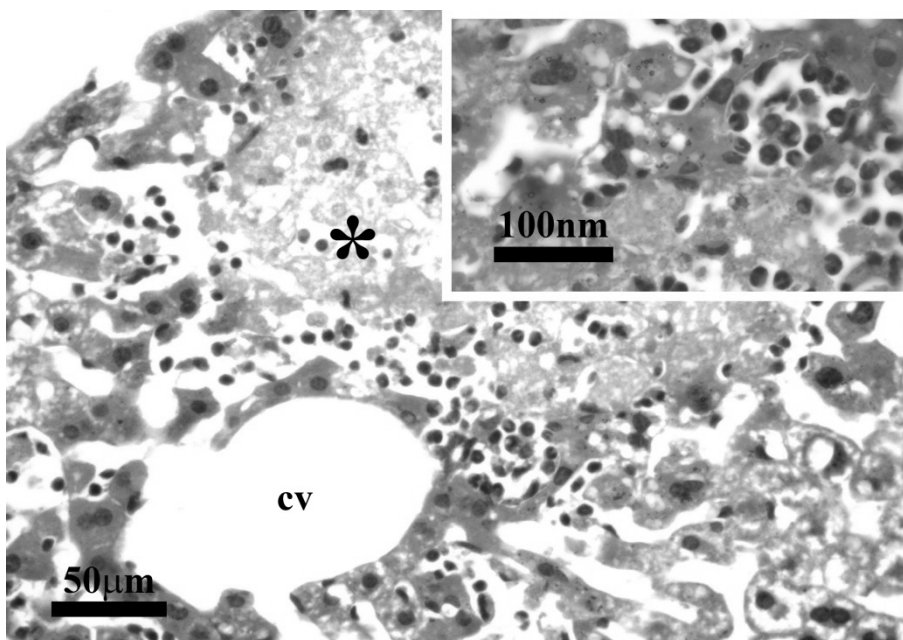


Figure 7 Micrograph of sectioned (3-5 μm thick) and H&E stained liver tissue surrounding the central vein of Dex mice, bar 50 μm . Tissue necrosis (*) and white blood cells (insert) including eosinophils and lymphocytes were observed, bar 100 nm. (cv: central vein).

เอกสารอ้างอิง

1. Martins JP, Monteiro JC and Paixao AD. Renal function in adult rats subjected to prenatal dexamethasone. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:32-37.
2. Costantini D, Marasco V, Moller AP. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *J Comp Physiol B* 2011;181:447-456.
3. Fonnum F, Myhrer T, Paulsen RE, Wangen K, Oksengard AR. Role of glutamate and glutamate receptors in memory function and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1995;757:475-486.
4. Estupina C, Abarca J, Arancibia S, Belmar J. N-methyl-D-aspartate receptor involvement in dexamethasone and stress-induced hypothalamic

- somatostatin release in rats. *Neurosci Lett* 1996;219: 203-206.
5. Ismail K, Wessely S. Psychiatric complications of corticosteroid therapy. *Br J Hosp Med* 1995;53: 495-499.
 6. Kiraly SJ, Ancill RJ, Dimitrova G. The relationship of endogenous cortisol to psychiatric disorder: a review. *Can J Psychiatry* 1997;42:415-420.
 5. Morita K, Ishimura K, Tsuruo Y, Wong DL. Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors. *Brain Res* 1999;816: 309-316.
 6. Demeule M, Jodoin J, Beaulieu E, Brossard M, Beliveau R. Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues. *FEBS Lett* 1999;442, 208-214.
 7. Micuda S, Fuksa L, Mundlova L, Osterreicher J, Mokry J, Cermanova J, Brckova E, Staud F, Pokorna P, Martinkova J. Morphological and functional changes in p-glycoprotein during dexamethasone-induced hepatomegaly. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:296-303.
 8. Roussel D, Dumas JF, Simard G, Malthiery Y, Ritz P. Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after dexamethasone treatment. *Biochem J* 2004;382, 491-499.
 9. Liu Y, van Goor H, Havinga R, Baller JF, Bloks VW, van der Leij FR, Sauer PJ, Kuipers F, Navis G, de Borst MH. Neonatal dexamethasone administration causes progressive renal damage due to induction of an early inflammatory response. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:768-776.
 10. de Vries WB, van den Borne P, Goldschmeding R, de Weger RA, Bal MP, van Bel F, van Oosterhout MF. Neonatal dexamethasone treatment in the rat leads to kidney damage in adulthood. *Pediatr Res* 2010;67: 72-76.
 11. Moller P, Lohr M, Folkmann JK, Mikkelsen L, Loft S. Aging and oxidatively damaged nuclear DNA in animal organs. *Free Radic Biol Med* 2010;48: 1275-1285.
 12. Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Curr Med Chem* 2011;18:3871-3888.
 13. Lengsfeld C, Titgemeyer F, Faller G, Hensel A. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J Agric Food Chem* 2004;52:1495-1503.
 14. Hedin PA, Lamar PL, Thompson AC, Minyard JP. Isolation and structural determination of 13 flavonoid glycosides in *Hibiscus esculentus* (okra). *Am J Bot* 1968;55:431-437.
 15. Shui G, Peng LL. An improved method for the analysis of major antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn. *J Chromatogr A* 2004;1048:17-24.
 16. Ansari NM, Houlihan L, Hussain B, Pieroni A. Antioxidant activity of five vegetables traditionally consumed by South-Asian migrants in Bradford, Yorkshire, UK. *Phytother Res* 2005;19:907-911.
 17. Gao Y, Chen ZW. Protective effect of *Abelmoschus manihot* L. medic against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Chin Pharmacol Bull* 2002;18:692-695.
 18. Cheng XP, Qin S, Dong LY, Zhou JN. Inhibitory effect of total flavone of *Abelmoschus manihot* L. Medic on NMDA receptor-mediated current in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Res* 2006;55: 142-145.
 19. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *J Agric Food Chem* 2006;54:9798-9804.
 20. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002;36:1199-1208.
 21. Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H, Ferreira M, Morquio A. Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1613-1620.
 22. Wang SP, Huang KJ. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2004;1032:273-279.
 23. Liu IM, Liou SS, Cheng JT. Mediation of beta-endorphin by myricetin to lower plasma glucose in strep-

- tozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2006;104:199-206.
24. Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol* 1997;29:121-126.
25. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002;76:560-568.
26. Deters AM, Lengsfeld C, Hensel A. Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro. *J Ethnopharmacol* 2005;102:391-399.
27. Tongjaroenbuangam W, Ruksee N, Chantiratikul P, Pakdeenarong N, Kongbuntad W, Govitrapong P. Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. *Neurochem Int* 2011;59:677-685.
28. Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett* 1997;409:12-16.
29. Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Regerat F, Demigne C, Remesy C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1259-1266.
30. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-747.
31. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiol Rev* 2010;90:1165-1194.
32. Marver D. Evidence of corticosteroid action along the nephron. *Am J of Physiol Renal Physiol* 1984;246:111-123.
33. Ortiz LA, Quan A, Zarzar F, Weinberg A, Baum M. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension* 2003;41:328-334.
34. Jane S, Madsen K, Nielsen FT, Skøtt O, Jensen BL. Glucocorticoid impairs growth of kidney outer medulla and accelerates loop of Henle differentiation and urinary concentrating capacity in rat kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:812-822.
35. Liu Y, van Goor H, Havinga R, Baller JF, Bloks VW, van der Leij FR, Sauer PJ, Kuipers F, Navis G, de Borst MH. Neonatal dexamethasone administration causes progressive renal damage due to induction of an early inflammatory response. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:768-776.
36. Chen A, Sheu LF, Ho YS, Lin YF, Chou WY, Wang JY, Lee WH. Administration of dexamethasone induces proteinuria of glomerular origin in mice. *Am J of Kidney Dis* 1998;31(3):443-452.
37. Woodhall PB, Craig TC. Response of the distal tubule and cortical collecting duct of vasopressin in the rat. *J of Clin Invest* 1973;52:3095-3108.
38. Weinstein AM, Weinbaum S, Duan Y, Du Z, Yan Q, Wang T. Flow-dependent transport in a mathematical model of rat proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(4):1164-1181.
39. Khomsug P, Tongjaroenbuangam W, Pakdeenarong N, Suttajit M, Chantiratikul P. Antioxidative activities and phenolic content of extracts from Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Res J Biol Sci* 2010;5:310-313.
40. Parichatikanond W, Pinthong D, Mangmool S. Blockade of the renin-angiotensin system with delphinidin, cyanin, and quercetin. *Planta Med* 2012;78(15):1626-1632.
41. Ojeda D, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Herrera-Arellano A, Tortoriello J, Alvarez L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *J Ethnopharmacol* 2010;127(1):7-10.
42. Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv Nutr* 2012;3:39-46.
43. Maronpot RR, Yoshizawa K, Nyska A, Harada T, Flake G, Mueller G, Singh B, Ward JM. Hepatic enzyme induction: histopathology. *Toxicol Pathol* 2010;38:776-795.
44. Chen X-W, Serag ES, Sneed KB, Zhou S-F. Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance. *Chemico-Biological Interactions* 2011;192:161-176.

45. Doreddula SK, Bonam SR, Gaddam DP, Rao Desu BS, Ramarao N, Pandey V. Phytochemical analysis, antioxidant, antistress, and nootropic activity of aqueous and methanolic seed extracts of ladies finger (*Abelmoschus esculentus* L.) in mice. *Scientific World J* 2014:1-14.
46. Hu L, Yu W, Li Y, Prasad N, Tang Z. Antioxidant activity of extract and its major constituents from okra seed on rat hepatocytes injured by carbon tetrachloride. *Bio Med Res Inter* 2014:1-9.