

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดใบรางจืด (*Thunbergia laurifolia*
Lindl.) ในการต้านการเหนียวนำไปเกิดไมโครนิวเคลียส
โดยสารฆ่าแมลงเมโทมิล

ชื่อผู้เขียน

นางสาวสกวรัตน์ บุญยะรัตน์

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พิษวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์ ประธานกรรมการ
ผศ.ดร. อำนาจ มีเวที กรรมการ

บทคัดย่อ

เมโทมิลเป็นสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตที่นิยมใช้กันมากในประเทศไทย และมีรายงานการศึกษาพบว่าสามารถทำให้เกิดความผิดปกติของดีเอ็นเอหรือการก่อกลายพันธุ์ได้ หากได้รับเป็นเวลานานต่อเนื่องกันในขนาดความเข้มข้นต่ำ ๆ การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์นำสมุนไพรรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) ซึ่งมีสรรพคุณในการแก้พิษสารพิษได้หลายชนิด รวมทั้งมีการใช้เป็นยาปรุงสำหรับรักษาโรคมะเร็งได้ด้วยมาทดสอบว่าสามารถช่วยลดความผิดปกติของดีเอ็นเอที่เกิดจากเมโทมิลได้หรือไม่ โดยใช้วิธีการเหนียวนำไปเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ ศึกษาทั้งในหลอดทดลองใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ของคน และในสัตว์ทดลองใช้เซลล์ไขกระดูกของหนูขาว

ใบรางจืดที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้เก็บจากบริเวณทางเข้าอุทยานแห่งชาติออบขาน จังหวัดเชียงใหม่ และทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาบดและสกัดด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) การศึกษาในหลอดทดลองทำโดยนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกจากเลือดของอาสาสมัครชายและหญิงจำนวน 10 ราย เลี้ยงเซลล์ในสารละลาย RPMI 1640 และ fetal calf serum มี streptomycin และ ampicillin เป็นสารปฏิชีวนะผสมอยู่ กระตุ้นให้เซลล์ลิมโฟไซท์แบ่งตัวด้วย phytohemagglutinin ก่อนเติมสารสกัดใบรางจืดและเมโทมิลที่ละลายในน้ำในหลอดเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ

24, 36 และ/หรือ 48 ชั่วโมง ใช้สารละลาย cytochalasin B เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 68 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ด้วยสี Giemsa นับจำนวนไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell จำนวน 1,000 เซลล์ ทั้งนี้ได้ทำการหา nuclear division index ด้วยทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

ผลการศึกษพบว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell ที่เหนี่ยวนำด้วยเมโรมิทได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) จากร้อยละ 2.90 ± 0.31 เป็น 1.24 ± 0.32 และ 1.18 ± 0.47 ตามลำดับในอาสาสมัครชาย และจากร้อยละ 3.24 ± 0.31 เป็น 1.54 ± 0.45 และ 1.40 ± 0.36 ตามลำดับในอาสาสมัครหญิง เมื่อให้สารสกัดใบรางจืดครั้งเดียวก่อนการเติมสารละลายเมโรมิท และจากร้อยละ 2.90 ± 0.31 เป็น 1.50 ± 0.30 และ 1.44 ± 0.26 ตามลำดับในอาสาสมัครชาย และจากร้อยละ 3.24 ± 0.31 เป็น 1.46 ± 0.32 และ 1.42 ± 0.40 ตามลำดับในอาสาสมัครหญิง เมื่อให้สารสกัดใบรางจืดสองครั้งก่อนการเติมสารละลายเมโรมิท และสารสกัดใบรางจืดซึ่งไม่มีผลทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสแต่อย่างใด

การศึกษาในหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้และเมียจำนวนเพศละ 5 ตัว พบว่าสารสกัดใบรางจืด 3 ความเข้มข้น (25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เมื่อป้อนให้หนูขาวเป็นเวลา 3 วัน ก่อนการฉีดเมโรมิท (2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เข้าทางช่องท้อง สามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสที่เหนี่ยวนำด้วยเมโรมิทใน polychromatic erythrocytes (PCEs) ในไขกระดูกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากร้อยละ 3.16 ± 0.81 เป็น 1.88 ± 0.70 , 1.20 ± 0.61 และ 0.84 ± 0.21 ตามลำดับในหนูขาวเพศผู้ และจากร้อยละ 2.00 ± 0.28 เป็น 1.32 ± 0.30 , 0.80 ± 0.44 และ 0.64 ± 0.32 ตามลำดับในหนูขาวเพศเมีย จำนวนไมโครนิวเคลียสที่ลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืดที่เพิ่มขึ้นในหนูขาวทั้งสองเพศ

การศึกษครั้งนี้สรุปได้ว่าการให้สารสกัดใบรางจืดไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมหรือไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ของคน และเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวแต่สามารถป้องกันการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสโดยสารฆ่าแมลงเมโรมิทได้

Thesis Title	Antagonistic Effect of <i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl. Leaf Extract on Micronucleus Induction by Methomyl Insecticide
Author	Miss. Skawratt Boonyaratt
Degree	Master of Science (Toxicology)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Werawan Ruangyuttikarn Chairman Asst. Prof. Dr. Umnat Mevatee Member

ABSTRACT

Methomyl is a carbamate insecticide used extensively in Thailand. Chronic low level exposure of methomyl was found to be genotoxic and mutagenic. The objective of this study was to investigate the antagonistic effect of Rang Jert (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) leaf extract, which had been used as an antidote for several toxic agents and also cancer therapy, against micronucleus (MN) induction of methomyl insecticide. The experiments included the use of cultured human lymphocytes (*in vitro* MN assay) and rat bone marrow cells (*in vivo* MN assay).

Fresh Rang Jert leaves were collected from the entrance area of Ob-Khan National Park, Chiang Mai, Thailand. They were washed and dried at room temperature, blended and extracted with hot water (90-100°C). Lymphocytes were isolated from peripheral blood of 10 healthy male and female volunteers. The suspended cells were added to the RPMI 1640 culture media, which contained antibiotics, streptomycin and ampicillin, and 20% fetal calf serum. Cell growth was stimulated by phytohemagglutinin. The cultured lymphocytes were treated with Rang Jert leaf extract before and after exposure to methomyl at 12 and 24 h. Lymphocyte cytokinesis was blocked by cytochalasin B after cultivating the cells for 68 h. The cells were stained with Giemsa, and the

micronuclei were counted per 1,000 binucleated cells. Nuclear division index was also determined in every experiment.

The results showed that pre-treatment of human lymphocytes with Rang Jert leaf extract at concentrations of 0.5 and 1.0 µg/ml significantly ($P<0.01$) reduced the number of MN inductions by methomyl from $2.90 \pm 0.31\%$ to $1.24 \pm 0.32\%$ and $1.18 \pm 0.47\%$, respectively, in males and from $3.24 \pm 0.31\%$ to $1.54 \pm 0.45\%$ and $1.40 \pm 0.36\%$, respectively, in females. Double doses of Rang Jert leaf extract pre-treatment prior to methomyl was able to reduce the number of MN inductions from $2.90 \pm 0.31\%$ to $1.50 \pm 0.30\%$ and $1.44 \pm 0.26\%$, respectively, in males and from $3.24 \pm 0.31\%$ to $1.46 \pm 0.32\%$ and $1.42 \pm 0.40\%$, respectively, in females.

When Rang Jert leaf extract was fed to 5 Sprague-Dawley rats at concentrations of 25, 250 and 2,500 mg/kg b.w. for 3 days followed by an intraperitoneal injection of methomyl at a concentration of 2 mg/kg b.w., it significantly decreased the number of micronuclei in polychromatic erythrocytes in a dose-dependent response from $3.16 \pm 0.81\%$ to $1.88 \pm 0.70\%$, $1.20 \pm 0.61\%$ and $0.84 \pm 0.21\%$, respectively, in male rats and from $2.00 \pm 0.28\%$ to $1.32 \pm 0.30\%$, $0.80 \pm 0.44\%$ and $0.64 \pm 0.32\%$, respectively, in female rats.

These findings suggested that Rang Jert leaf extract had no effect on the induction of micronucleus formation in human lymphocytes and rat bone marrow cells. However, it was an effective antimutagenic substance for methomyl.