Thesis Title Effect of *Thunbergia laurifolia* Lindl. Leaf Extract on Methomyl-Induced Cholinesterase Inhibition

Author Miss Kanokwan Chaiyasing

Degree Master of Science (Toxicology)

Thesis Advisory Committee

Associate Professor Dr. Werawan Ruangyuttikarn	Chairperson
Associate Professor Dr. Taweeporn Sittiracha	Member
Dr. Chaiyong Rujjanavate	Member

ABSTRACT

Thunbergia laurifolia Lindl., commonly known as "Rangjuet", is used as an antidote for several poisonous agents in Thai traditional medicine. It was reported that an aqueous extract of fresh *T. laurifolia* leaf could protect rats against the toxic effects of insecticide-induced cholinesterase (ChE) inhibition. However, the mechanism of its antagonistic effect is not yet known.

Methomyl is a highly toxic carbamate insecticide used extensively in Thailand. It induces acute cholinergic poisoning in mammals by inhibiting ChE activity. This study was designed to investigate the protection *T. laurifolia* leaf extract (TLE) has against the acute effect of methomyl-induced ChE inhibition, by determining the increase of ChE level in pooled human and rat serum. It also determined the number of acetylcholinesterase (AChE) neurons and nerve fibers intensity of the enteric nervous system in Sprague-Dawley rats.

In, *in vitro* experiments, 0.121 mg/ml of methomyl was incubated with pooled human serum at 5, 15 or 30 minutes as control groups. TLE at three concentrations of 1.56, 6.25 or 25.00 mg/ml was incubated with 0.121 mg/ml of methomyl and pooled human serum at 5, 15 or 30 minutes.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

The result demonstrated that TLE could significantly reduce the effect of methomyl-induced ChE inhibition ($P<0.05$).

In, *in vivo* experiments, male and female rats were devided into 3 control and 3 experimental groups. The control groups were orally fed with 4.1 mg/kg of methomyl. The experimental groups were orally fed with 1) a single dose of 2.0 g/kg of TLE, concurrently with 4.1 mg/kg of methomyl 2) pre-treated with 2.0 g/kg of TLE, 30 minutes prior to the administration of 4.1 mg/kg of methomyl or 3) post-treated with 2.0 g/kg of TLE, 5 minutes after administration of 4.1 mg/kg of methomyl. Rat blood was collected from the tail at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120 and 180 minutes after methomyl administration. The results show that all of the TLE treatment significantly increased the ChE activity ($P<0.05$) that was inhibited by methomyl. The pattern of ChE activity in male rats was similar to that shown in female rats. However, male rats seemed to be more responsive to the activity of TLE in antagonising the effect of methomyl insecticide than the female rats. It was also shown that the TLE pre-treatment was more effective than the treatment of TLE given at same time as methomyl administration and treatment with TLE after methomyl administration (TLE post-treatment).

Rats treated continuously with 0.5 and 5.0 g/kg of TLE for 7 days, showed an increase of ChE activity that significantly ($P<0.05$) compared to the control groups, which were treated with methomyl only. The pattern of ChE activity was similar to that in the rats treated with a single dose of TLE. The antagonistic effect of methomyl toxicity by TLE was dose-related.

Neurons and nerve fibers were examined histochemically to show AChE-positive plexuses in the rat's duodenum. In this case, rats were divided into 1 control group and 2 expermental groups. In the control group, rats were orally fed with methomyl at 4.1 mg/kg. The experimental groups were orally pre-treated with 2.0 g/kg of TLE 30 minutes prior to the administration of 4.1 mg/kg of methomyl, and post-treated with 2.0 g/kg of TLE 5 minutes after the administration of 4.1 mg/kg of methomyl. A reddish brown cupric ferrocyanide precipitation was found in AChE-positive neurons and nerve fibers. The intensity of the color reflected the concentration of the enzyme. These experiments show that TLE increased the numbers of AChE-positive neurons, and color intensity of nerve fibers in the rat's duodenum myenteric plexuses after reducing both numbers and color intensity of the neurons and nerve fibers induced by methomyl insecticide. The number of AChE-positive neurons in the myenteric plexus was also significantly increased ($P<0.01$) by more than the number of neurons found in rats treated with methomyl alone.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

These results suggest that *T. laulifolia* leaf extract could be a protective agent for methomyl-induced ChE inhibition.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารกำจัดแมลงเมโทมิล

ผู้เขียน นางสาวกนกวรรณ ไชยสิงห์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พิษวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ทวีพร สิทธิราชา	กรรมการ
ดร. ไชยยง รุจจนเวท	กรรมการ

บทคัดย่อ

รางจืดหรือ *Thunbergia laurifolia* Lindl. เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณระบุในตำราแพทย์แผนไทยว่าสามารถแก้พิษสารพิษได้หลายชนิด มีรายงานว่าน้ำสกัดจากใบรางจืดสดสามารถต้านความเป็นพิษสารกำจัดแมลงในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสได้ในหนูขาว อย่างไรก็ตามกลไกการต้านความเป็นพิษยังไม่ทราบชัดเจน

เมโทมิลเป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มคาร์บาเมตที่มีความเป็นพิษสูงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมเมโทมิลทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อเนื้อเยื่อที่ถูกควบคุมโดยสารสื่อประสาทกลุ่มโคลิเนอจิก โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านฤทธิ์เฉียบพลันของเมโทมิลที่ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส โดยทดสอบกับเอนไซม์โคลีนเอนเทอเรสในซีรัมของคน ในซีรัมของหนูขาว และระดับเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ระบบประสาทในผนังลำไส้เล็กของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley

การศึกษาในหลอดทดลอง ใช้เมโทมิล 0.121 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับซีรัมคน เป็นเวลา 5, 15 หรือ 30 นาทีเป็นกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มทดลองใช้สารสกัดใบรางจืด 3 ความเข้มข้นคือ 1.56, 6.25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หรือ 25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับเมโทมิลความเข้มข้น 0.121 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและซีรัมคนเป็นเวลา 5, 15 หรือ 30 นาที ผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสของเมโทมิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การศึกษาในสัตว์ทดลองใช้หนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมีย แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างละ 3 กลุ่ม กลุ่มควบคุมป้อนเมโทมิลขนาด 4.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มทดลองป้อนสารสกัดใบรางจืด 3 วิธีคือ 1) สารสกัดใบรางจืดขนาด 2.0 กรัมต่อกิโลกรัมพร้อมกับเมโทมิลขนาด 4.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2) สารสกัดใบรางจืดขนาด 2.0 กรัมต่อกิโลกรัม ก่อนเมโทมิลขนาด 4.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 30 นาที และ 3) สารสกัดใบรางจืดขนาด 2.0 กรัมต่อกิโลกรัม หลังเมโทมิลขนาด 4.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 5 นาที จากนั้นเก็บเลือดจากหางหนูเพื่อวัดระดับเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ที่เวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาทีหลังได้รับเมโทมิล ผลการทดลองพบว่าการให้สารสกัดใบรางจืดทุกวิธีสามารถเพิ่มระดับเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเมโทมิลเพียงอย่างเดียว และการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในหนูทั้งสองเพศมีลักษณะคล้ายกัน อย่างไรก็ตามในหนูเพศผู้พบว่ามีระดับเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าเพศเมีย และการให้สารสกัดใบรางจืดก่อนที่จะได้รับเมโทมิลให้ประสิทธิภาพในการต้านพิษดีกว่าเมื่อให้ตามหลัง

หนูขาวที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดขนาด 0.5 และ 5.0 กรัมต่อกิโลกรัมเป็นเวลา 7 วันต่อเนื่องกัน พบว่ามีระดับเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเมโทมิลอย่างเดียว ลักษณะของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่เพิ่มขึ้นคล้ายกับที่พบจากการศึกษาที่ให้สารสกัดใบรางจืดแบบครั้งเดียว การต้านความเป็นพิษของเมโทมิลโดยสารสกัดใบรางจืดนั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืดที่เพิ่มขึ้น

การศึกษาผลต่อเซลล์ประสาทและใยประสาทโดยใช้เทคนิคการย้อมทางฮีสโทเคมีนั้น ใช้วิธีย้อมดูกลุ่มเซลล์ประสาทที่มีเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในผนังลำไส้เล็กหนูขาวส่วนต้น โดยแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่มและกลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม กลุ่มควบคุมป้อนเมโทมิล 4.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนกลุ่มทดลองป้อนสารสกัดใบรางจืดขนาด 2.0 กรัมต่อกิโลกรัม ครั้งเดียวเมื่อเวลา 30 นาทีก่อนให้เมโทมิลขนาด 4.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และป้อนสารสกัดใบรางจืดขนาด 2.0 กรัมต่อกิโลกรัมหลังได้รับเมโทมิลแล้ว 5 นาที ผลการย้อมสีเห็นตะกอนสีน้ำตาลแดงของ cupric ferrocyanide ในเซลล์ประสาทและใยประสาทที่มีเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งความเข้มของสีสัมพันธ์โดยตรงกับระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ประสาทและความเข้มของสีของใยประสาทที่มีเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ในผนังลำไส้เล็กหนูขาวส่วนต้นหลังจากได้รับเมโทมิลได้ และเพิ่มจำนวนเซลล์ประสาทที่ติดสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับเมโทมิลเพียงอย่างเดียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบรางจืดสามารถป้องกันการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารกำจัดแมลงเมโทมิลได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved