บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดใบรางจืด

เมื่อนำผงใบรางจืดแห้งมาสกัดด้วยน้ำร้อนต้มเดือดในอัตราส่วน 1:10 (W:V) พบว่าสารสกัดใบรางจืดที่ได้หลังจากทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลเข้ม และได้ yeild ประมาณร้อยละ 10-12 ของน้ำหนักใบรางจืดแห้ง

2. ผลการศึกษาไมโครนิวเคลียสในหลอดทดลอง (*in vitro* experiments)

การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมโดยวิธีไมโครนิวเคลียส โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ของอาสาสมัครเพศชาย และหญิง เพศละ 5 ราย พบว่าไมโครนิวเคลียสมีลักษณะกลม ขอบเรียบชัดเจน ติดสีเช่นเดียวกับนิวเคลียสใหญ่แต่มีขนาดเล็ก และเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่ามีหลายลักษณะดังต่อไปนี้

ก. Mononucleated cell เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่มี 1 นิวเคลียส มีลักษณะของนิวเคลียสติดสีชัดเจน ไซโตพลาสซึมติดสีสม่ำเสมอ ขอบเขตชัดเจน และไม่มีไมโครนิวเคลียส (รูปที่ 10 ก)

ข. Binucleated cell เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่มี 2 นิวเคลียส มีลักษณะของเซลล์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีการใช้ cytochalasin B ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ขณะที่กำลังแบ่งตัว 1 รอบ และมี 1 หรือ 2 ไมโครนิวเคลียส (รูปที่ 10 ค,ง) หรือไม่มีไมโครนิวเคลียส (รูปที่ 10 ข)

ค. Trinucleated cell เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่มี 3 นิวเคลียส เป็นลักษณะของเซลล์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีการใช้ cytochalasin B ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ขณะที่นิวเคลียสใดนิวเคลียสหนึ่งของ binucleated cell กำลังแบ่งตัวรอบสอง และพบ 1 ไมโครนิวเคลียส (รูปที่ 11 ก)

ง. Tetranucleated cell เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่มี 4 นิวเคลียส เป็นลักษณะของเซลล์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีการใช้ cytochalasin B ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ขณะที่นิวเคลียสของ binucleated cell กำลังแบ่งตัวรอบสอง หรือนิวเคลียสใดนิวเคลียสหนึ่งของ trinucleated cell กำลังแบ่งตัวรอบสอง โดยอาจพบหรือไม่พบไมโครนิวเคลียส (รูปที่ 11 ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ. Apoptotic cell เป็นเซลล์ที่ตาย โดยดูความหนาแน่นของโครมาตินภายในนิวเคลียส นิวเคลียสจะแตกและไซโตพลาสซึมติดสีเข้ม (รูปที่ 11 ค)

ฉ. Necrotic cell เป็นเซลล์ที่ตาย มีการสูญเสียไซโตพลาสซึมของเซลล์ไป นิวเคลียสใหญ่แสดงลักษณะเซลล์ที่บวมแตกจนไม่เห็นไซโตพลาสซึม หรือเกิดเป็นช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (รูปที่ 11 ง)

การคำนวณหาค่าดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์ หรือ nuclear division index (NDI) ต้องนับจำนวนเซลล์ทั้ง 6 ชนิดนี้ (ก-ฉ) เพื่อดูการแบ่งตัวของเซลล์และใช้บอกความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ โดยค่า NDI ที่ได้ต้องไม่แตกต่างกันกับหลอดควบคุม เพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์การเกิดไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell ที่ได้รับสารทดสอบ

2.1 ผลการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์คนในหลอดทดลองเมื่อ

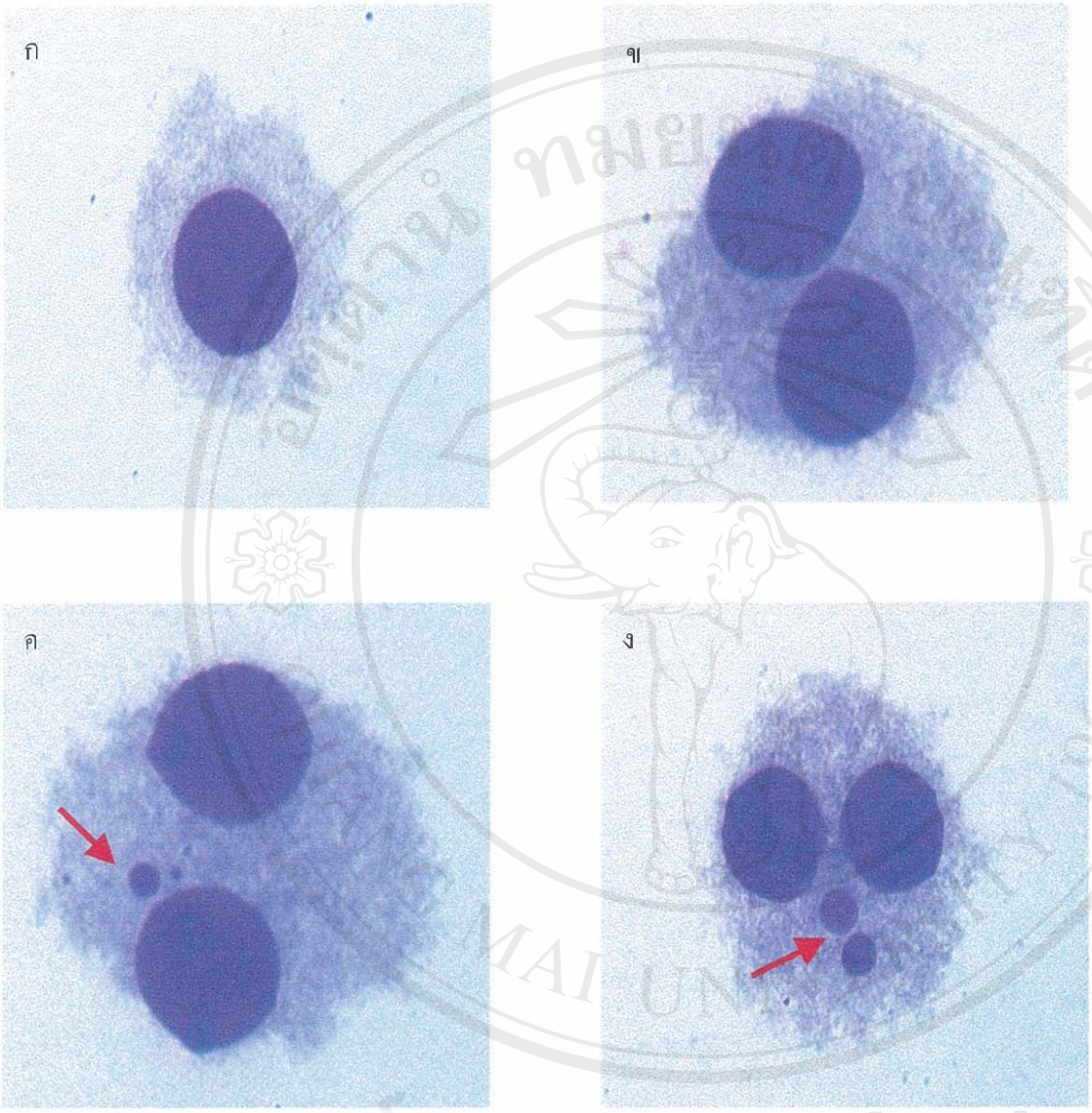
2.1.1 เหนี่ยวนำด้วย mitomycin C

ทดสอบ mitomycin C (MMC) 7 ความเข้มข้น คือ 0.010, 0.025, 0.050, 0.100, 0.250, 0.500 และ 1.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มาตรวจหาไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell (BNMN) จำนวน 1,000 เซลล์ พบว่า MMC ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้เท่ากับ 3.4% ดังนั้นจึงใช้ MMC ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น positive control รายละเอียดแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 12

2.1.2 เหนี่ยวนำด้วยเมโธมิล

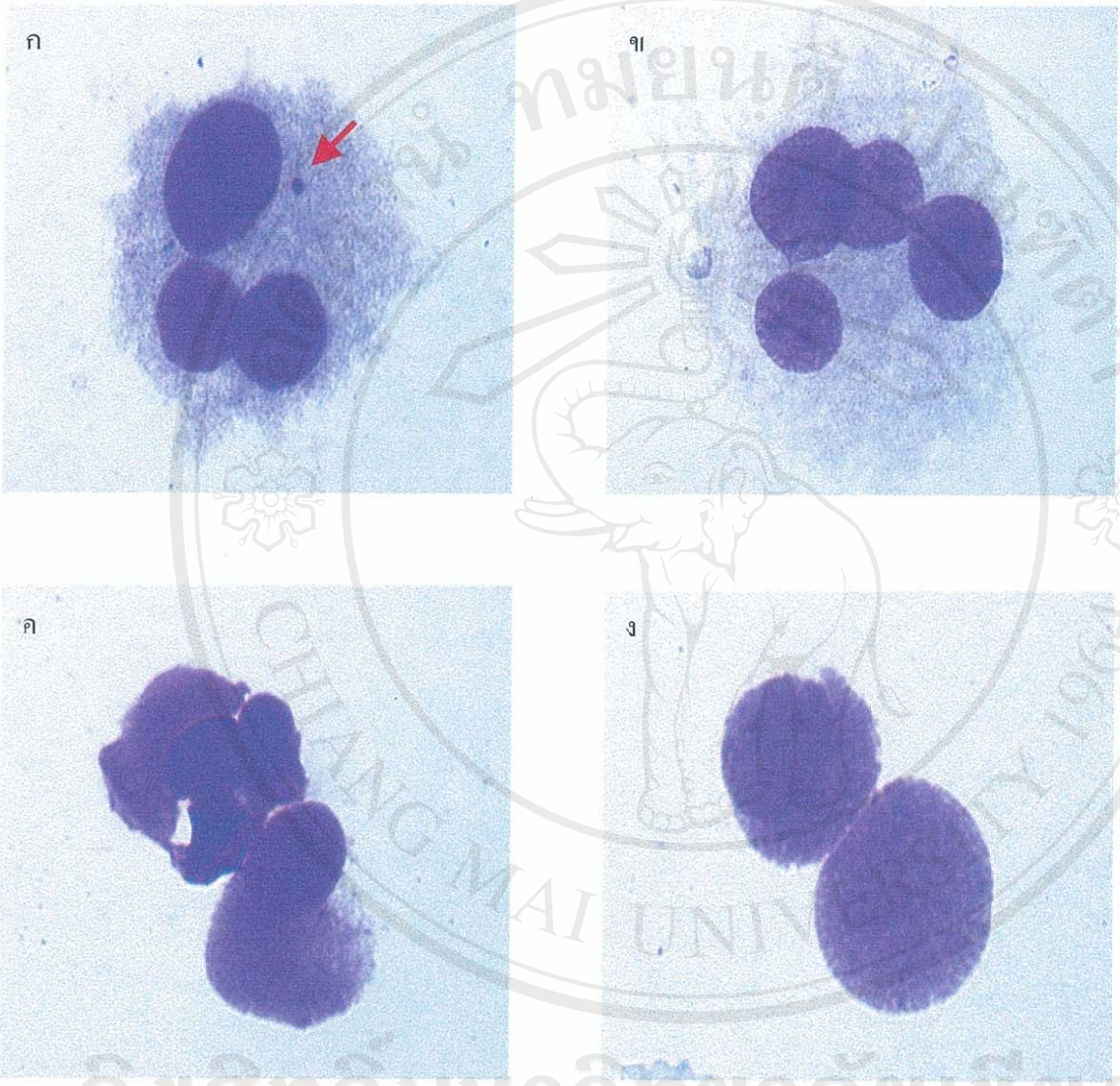
ทดสอบเมโธมิล 7 ความเข้มข้น คือ 0.04, 0.17, 0.35, 0.70, 1.40, 2.80 และ 5.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มาตรวจหาไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell (BNMN) จำนวน 1,000 เซลล์ พบว่าเมโธมิลที่ความเข้มข้น 1.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้ maximum response ใน dose-response curve คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้สูงสุดเท่ากับ 3.2% ดังนั้นจึงใช้เมโธมิลความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรมาเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของเมทโธมิล รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 10 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์จากอาสาสมัคร บนสไลด์ที่ย้อมด้วยสี Giemsa เห็นนิวเคลียสลักษณะต่าง ๆ ดังนี้: ก. mononucleated cell ข. binucleated cell ค. binucleated cell และพบ 1 ไมโครนิวเคลียส ง. binucleated cell และพบ 2 ไมโครนิวเคลียส (ลูกศรชี้ คือไมโครนิวเคลียส)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

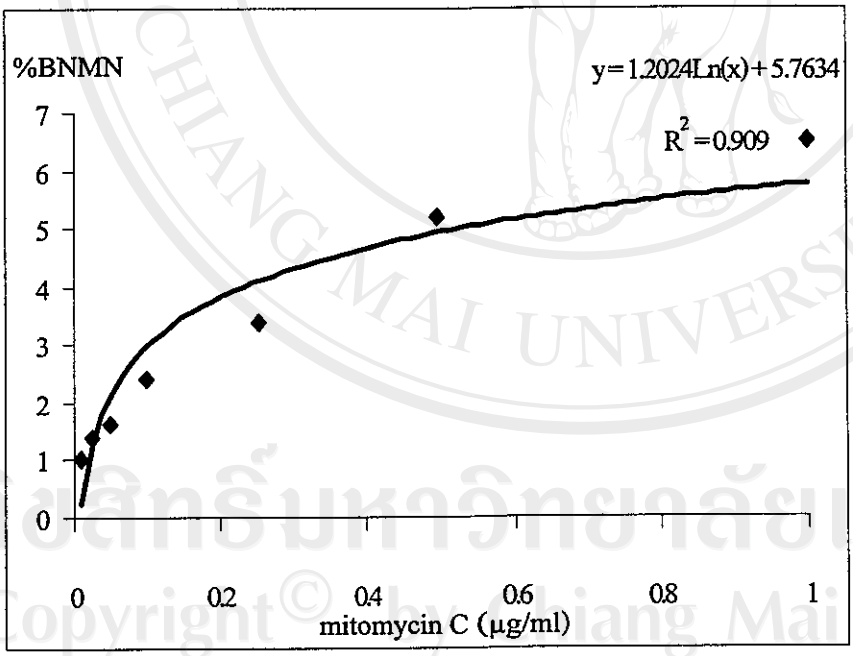


รูปที่ 11 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์จากอาสาสมัคร บนสไลด์ที่ย้อมด้วยสี Giemsa เห็นนิวเคลียสลักษณะต่าง ๆ ดังนี้: ก. trinucleated cell และพบ 1 ไมโครนิวเคลียส ข. tetranucleated cell ค. apoptotic cell ง. necrotic cell (ลูกศรชี้ คือไมโครนิวเคลียส)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 จำนวนร้อยละของไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell (BNMN) ต่อ binucleated cell จำนวน1,000 เซลล์ เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสโดย mitomycin C ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

MMC (µg/ml)	%BNMN
0.010	1
0.025	1.4
0.050	1.6
0.1	2.4
0.25	3.4
0.5	5.2
1	6.5

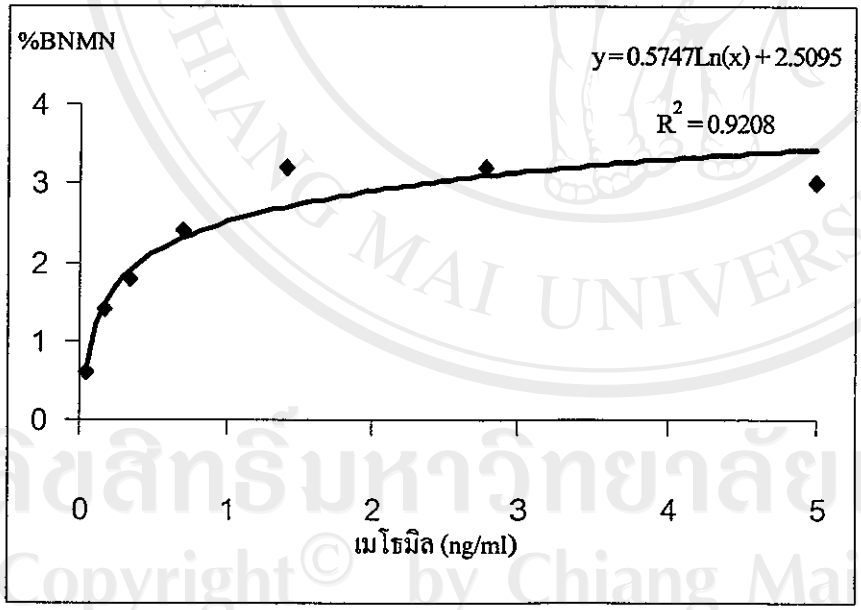


รูปที่ 12 Dose-response curve ของ mitomycin C ในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 จำนวนร้อยละของไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell (BNMN) ต่อ binucleated cell จำนวน 1,000 เซลล์ เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสโดยเมโธมิล ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.04-5.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เมโธมิล (ng/ml)	%BNMN
0.04	0.6
0.17	1.4
0.35	1.8
0.70	2.4
1.40	3.2
2.80	3.2
5.00	3.0



รูปที่ 13 Dose-response curve ของเมโธมิลในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดใบรางจืด

ทดสอบสารสกัดใบรางจืด 5 ความเข้มข้น คือ 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ของคนมาตรวจหาไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell (BNMN) จำนวน 1,000 เซลล์ พบว่าสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่ทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างเดียว แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบรางจืดมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้ ดังนั้นจึงใช้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของเมทโธมิล รายละเอียดแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 14

2.2 ผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียส

2.2.1 เซลล์ได้รับสารสกัดใบรางจืดก่อนเมโธมิล (pre-treatment)

ในการทดสอบนี้จะมีการให้สารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบบ single dose คือให้สารสกัดใบรางจืดในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ครบ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์แบ่งตัวครบ 1 รอบ แล้วจึงเติมเมโธมิลความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และให้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.50 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแบบ double doses คือให้สารสกัดใบรางจืดในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซท์ครบ 24 และ 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์แบ่งตัวครบ 1 รอบ และ 1 รอบครึ่ง แล้วจึงเติมเมโธมิลความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

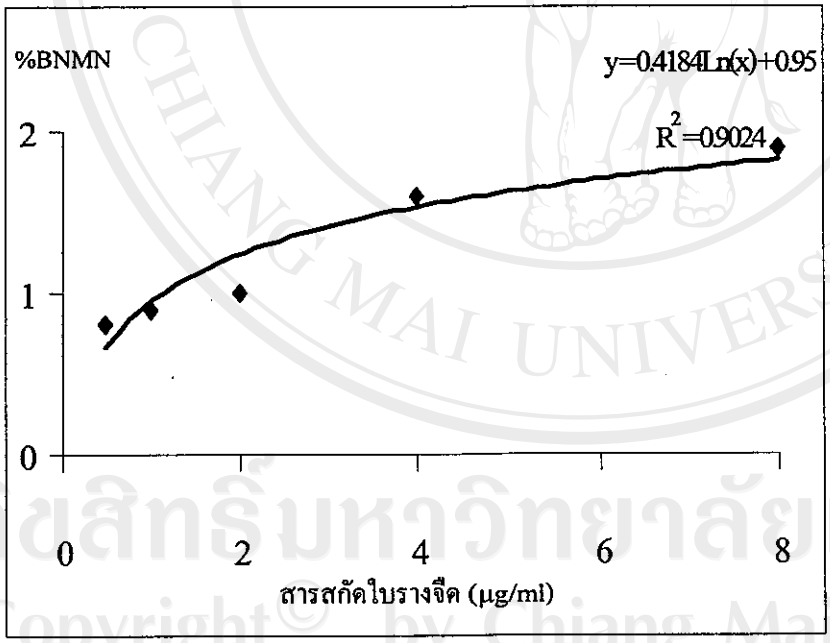
ในหลอดทดลองที่เติมเมโธมิลหลังจากเซลล์ได้รับสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแบบ single dose และ double doses พบว่าสามารถลดจำนวนของไมโครนิวเคลียสใน binucleatd cell ทั้งของอาสาสมัครชายและหญิง แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโธมิลได้เมื่อให้ก่อนการได้รับเมโธมิล โดยที่สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบบ single dose และ double doses พบว่าไม่มีผลทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสใน binucleatd cell เพิ่มขึ้นทั้งอาสาสมัครชายและหญิง โดยมีหลอดทดลองที่ให้น้ำกลั่นอย่างเดียวเป็น negative control รายละเอียดแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 15

สำหรับค่าดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์ พบว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.50 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแบบ single dose และ แบบ double doses และเมโธมิลความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทั้งของอาสาสมัครชายและหญิง เมื่อเปรียบเทียบกับหลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 จำนวนร้อยละของไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell (BNMN) ต่อ binucleated cell จำนวน1,000 เซลล์ เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสโดยสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดใบรางจืด (µg/ml)	%BNMN
0.5	0.8
1.0	0.9
2.0	1.0
4.0	1.6
8.0	1.9



รูปที่ 14 Dose-response curve ของสารสกัดใบรางจืดในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 ค่า binucleated micronucleus (BNMN) และค่า nuclear division index (NDI) ของเซลล์ลิมโฟไซต์คน เมื่อได้รับสารสกัดใบรางจืดก่อนการสัมผัสเมโธมิลเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

หลอดทดลองที่	สารทดสอบ (ความเข้มข้น)	%BNMN (เพศชาย)	%BNMN (เพศหญิง)	NDI (เพศชาย)	NDI (เพศหญิง)
1	น้ำกลั่น (negative control)	0.98 ± 0.19	1.14 ± 0.25	1.15 ± 0.10	1.16 ± 0.10
2	MMC 0.25 µg/ml (positive control)	5.46 ± 1.16**	5.88 ± 0.57***	1.19 ± 0.08	1.10 ± 0.06
3	methomyl (1.40 ng/ml)	2.90 ± 0.31**	3.24 ± 0.31***	1.17 ± 0.06	1.12 ± 0.07
4	RJ (0.50 µg/ml)	0.88 ± 0.25	1.12 ± 0.24	1.16 ± 0.09	1.12 ± 0.07
5	RJ (1.00 µg/ml)	0.94 ± 0.33	1.24 ± 0.40	1.17 ± 0.12	1.18 ± 0.11
6	RJd (0.50 µg/ml)	1.02 ± 0.34	1.16 ± 0.46	1.17 ± 0.11	1.15 ± 0.13
7	RJd (1.00 µg/ml)	1.24 ± 0.35	1.40 ± 0.46	1.12 ± 0.05	1.14 ± 0.13
8	RJ (0.50 µg/ml) + methomyl	1.24 ± 0.32***	1.54 ± 0.45**	1.19 ± 0.06	1.12 ± 0.14
9	RJ (1.00 µg/ml) + methomyl	1.18 ± 0.47**	1.40 ± 0.36***	1.23 ± 0.12	1.17 ± 0.15
10	RJd (0.50 µg/ml) + methomyl	1.50 ± 0.30***	1.46 ± 0.32***	1.21 ± 0.09	1.13 ± 0.14
11	RJd (1.00 µg/ml) + methomyl	1.44 ± 0.26**	1.42 ± 0.40***	1.17 ± 0.11	1.21 ± 0.19

** $P<0.01$, *** $P<0.001$

RJ = สารสกัดใบรางจืดแบบ single dose

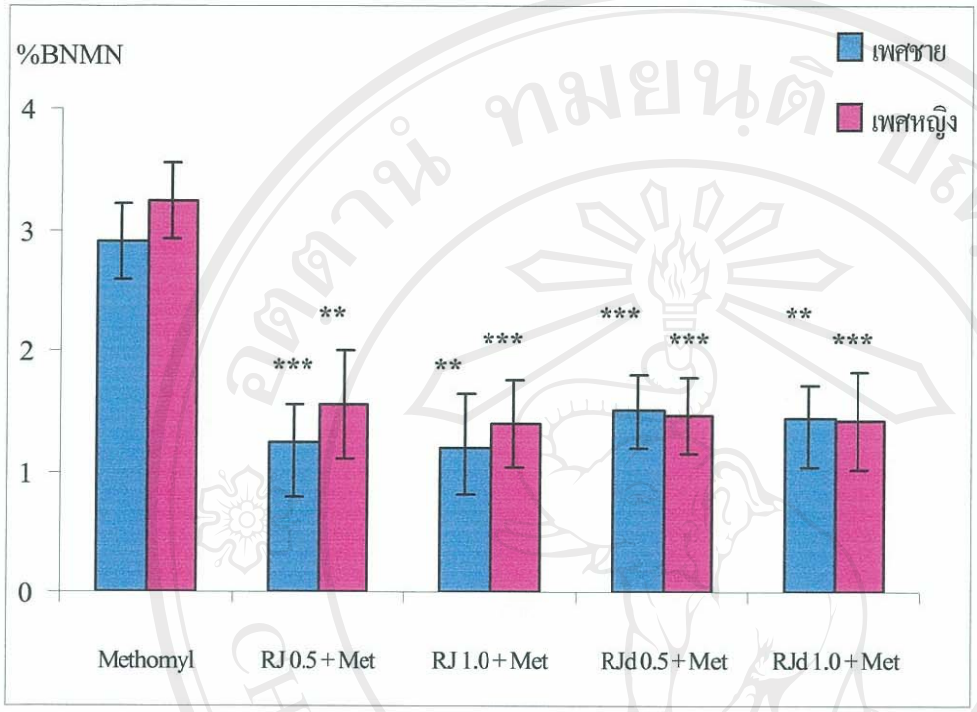
RJd = สารสกัดใบรางจืดแบบ double doses

%BNMN = จำนวนร้อยละของ binucleated cell ที่พบไมโครนิวเคลียสจากการตรวจวิเคราะห์ binucleated cell 1,000 เซลล์

NDCI = ดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์คนของอาสาสมัครชายและหญิง เพศละ 5 ราย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 15 เปรียบเทียบ %BNMN ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์คน อาสาสมัครชายและหญิง เมื่อได้รับสารสกัดใบรางจืดก่อนเมทโธมิลเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Met = เมทโธมิลความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

RJ = สารสกัดใบรางจืดแบบ single dose

RJd = สารสกัดใบรางจืดแบบ double doses

%BNMN = จำนวนร้อยละของ binucleated cell ที่พบไมโครนิวเคลียสจากการตรวจวิเคราะห์ binucleated cell 1,000 เซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดลองที่ให้น้ำกลั่นอย่างเดียว แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดและเมโธมิลไม่มีผลรบกวนการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์

2.2.2 เซลล์ได้รับสารสกัดใบรางจืดหลังได้รับเมโธมิลแล้ว (post-treatment)

การทดสอบนี้ให้เมโธมิลความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซท์ครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบบ single dose คือให้สารสกัดใบรางจืดในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ครบ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์แบ่งตัวครบ 2 รอบ และให้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.50 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแบบ double doses คือให้สารสกัดใบรางจืดในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ครบ 36 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์แบ่งตัวครบ 1 รอบครึ่ง และ 2 รอบ

ในหลอดทดลองที่ให้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแบบ single dose และ double doses หลังจากเซลล์ได้รับเมโธมิลแล้ว พบว่าไม่สามารถลดจำนวนของไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell ทั้งอาสาสมัครเพศชายและหญิง แสดงว่าการให้สารสกัดใบรางจืดหลังจากเซลล์ได้รับเมโธมิลแล้วไม่สามารถต้านการเกิดไมโครนิวเคลียสได้ โดยที่สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบบ single dose และ double doses ไม่มีผลทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell เพิ่มขึ้นทั้งอาสาสมัครชายและหญิง โดยมีหลอดทดลองที่ให้น้ำกลั่นอย่างเดียวเป็น negative control รายละเอียดแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 16

3. ผลการศึกษาไมโครนิวเคลียสในสัตว์ทดลอง (*in vivo* experiments)

ไมโครนิวเคลียสที่พบในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว มีลักษณะกลม ขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของนิวเคลียสของเซลล์อื่น ๆ ในไขกระดูก และพบเพียง 1 ไมโครนิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (รูปที่ 17) และเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อวิเคราะห์ภาวะการกดการแบ่งตัวเซลล์ไขกระดูกของสารทดสอบ โดยนับจำนวน polychromatic erythrocytes (PCEs) ใน normochromatic erythrocyte (NCEs) จำนวน 1,000 เซลล์ เพื่อหาอัตราส่วนระหว่าง PCEs ต่อ PCEs+NCEs ซึ่งจะต้องไม่น้อยกว่า 20% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (EPA, 1998) และวิเคราะห์จำนวนและลักษณะไมโครนิวเคลียสในแต่ละ PCEs จนครบ 1,000 เซลล์ ลักษณะของ PCEs และ NCEs เมื่อนำไปย้อมด้วย Leishman' stain มีความแตกต่างกัน คือ PCEs ติดสีน้ำเงินหรือม่วงจาง ๆ และ NCEs ติดสีแดงจาง ๆ หรือเหลือง (รูปที่ 18)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 ค่า binucleated micronucleus (BNMN) และค่า nuclear division index (NDI) ของเซลล์ลิมโฟไซท์คน เมื่อได้รับสกัดใบรางจืดหลังเมโธมิลเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

หลอดทดลองที่	สารทดสอบ (ความเข้มข้น)	%BNMN (เพศชาย)	%BNMN (เพศหญิง)	NDI (เพศชาย)	NDI (เพศหญิง)
1	น้ำกลั่น (negative control)	0.98 ± 0.19	1.14 ± 0.25	1.15 ± 0.10	1.16 ± 0.10
2	MMC 0.25 µg/ml (positive control)	5.44 ± 0.82***	6.02 ± 0.54***	1.17 ± 0.12	1.10 ± 0.06
3	methomyl (1.40 ng/ml)	3.14 ± 0.26***	3.30 ± 0.37**	1.16 ± 0.11	1.09 ± 0.11
4	RJ (0.50 µg/ml)	1.08 ± 0.60	1.18 ± 0.17	1.13 ± 0.08	1.10 ± 0.07
5	RJ (1.00 µg/ml)	1.16 ± 0.38	1.34 ± 0.27	1.16 ± 0.10	1.12 ± 0.08
6	RJd (0.50 µg/ml)	1.12 ± 0.30	1.26 ± 0.31	1.17 ± 0.13	1.11 ± 0.10
7	RJd (1.00 µg/ml)	1.32 ± 0.17	1.44 ± 0.26	1.19 ± 0.12	1.10 ± 0.14
8	methomyl + RJ (0.50 µg/ml)	3.44 ± 0.53	3.14 ± 0.38	1.22 ± 0.12	1.10 ± 0.08
9	methomyl + RJ (1.00 µg/ml)	3.12 ± 0.83	3.02 ± 0.43	1.21 ± 0.12	1.11 ± 0.14
10	methomyl + RJd (0.50 µg/ml)	2.86 ± 0.47	3.08 ± 0.10	1.17 ± 0.12	1.10 ± 0.08
11	methomyl + RJd (1.00 µg/ml)	3.08 ± 0.57	3.02 ± 0.14	1.18 ± 0.14	1.09 ± 0.09

** $P<0.01$, *** $P<0.001$

RJ = สารสกัดใบรางจืดแบบ single dose

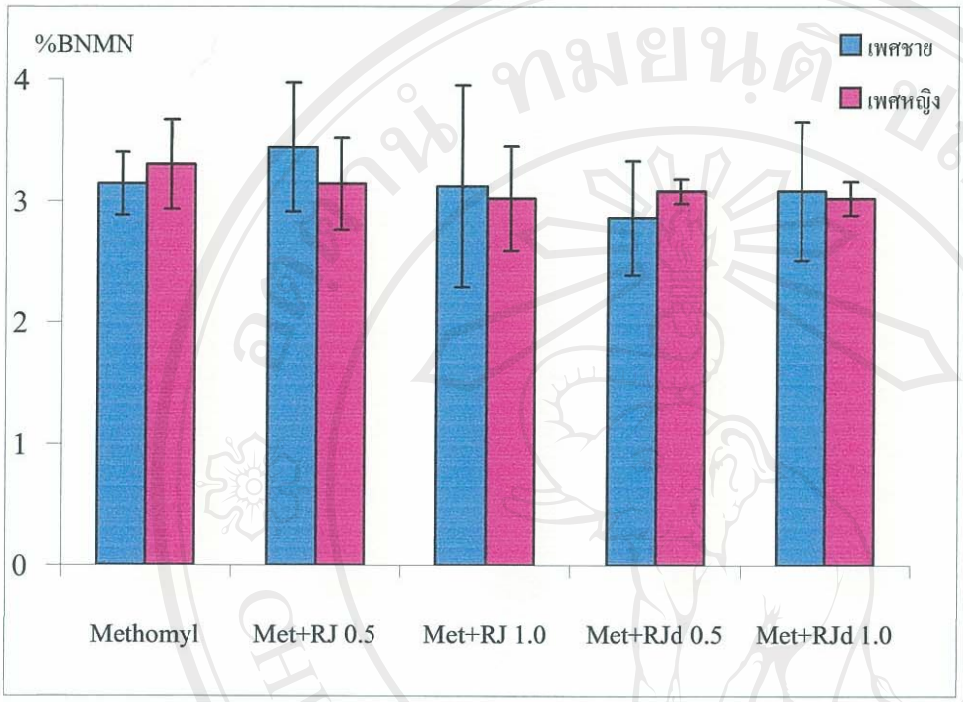
RJd = สารสกัดใบรางจืดแบบ double doses

%BNMN = จำนวนร้อยละของ binucleated cell ที่พบไมโครนิวเคลียสจากการตรวจวิเคราะห์ binucleated cell 1,000 เซลล์

NDCI = ดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์คนของอาสาสมัครชายและหญิง เพศละ 5 ราย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 16 เปรียบเทียบ %BNMN ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์คนเพศชายและหญิง เมื่อได้รับสารสกัดใบรางจืด**หลัง**จากเซลล์ได้รับเมทโธมิลแล้วเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

** $P<0.01$, *** $P<0.001$

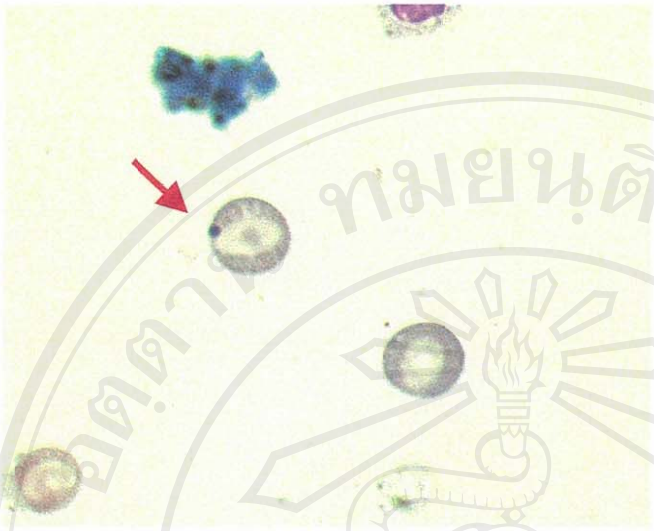
Met = เมทโธมิลความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

RJ = สารสกัดใบรางจืดแบบ single dose

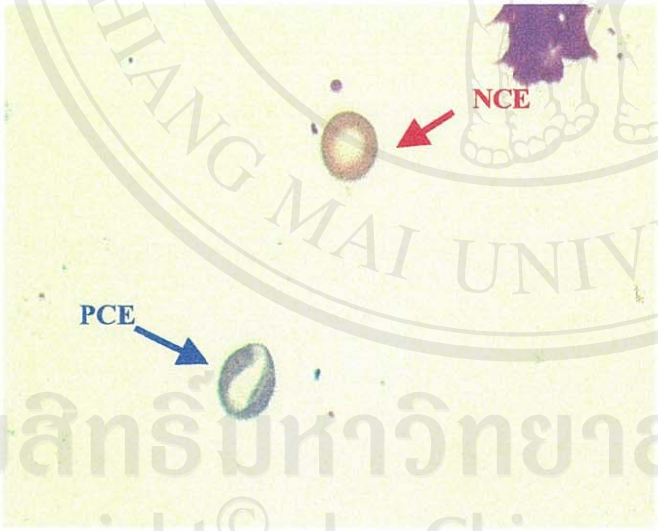
RJd = สารสกัดใบรางจืดแบบ double doses

%BNMN = จำนวนร้อยละของ binucleated cell ที่พบไมโครนิวเคลียสจากการตรวจวิเคราะห์ binucleated cell 1,000 เซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 17 ลักษณะของ polychromatic erythrocyte ในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวส่วนต้นขาที่มี 1 ไมโครนิวเคลียส (ลูกศร) กำลังขยาย 2,000 เท่า



รูปที่ 18 ลักษณะของ polychromatic erythrocyte (PCE) และ normochromatic erythrocytes (NCE) ในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวส่วนต้นขา กำลังขยาย 2,000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1 ผลทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว

3.1.1 เหนี่ยวนำด้วยเมโธมิล

เมื่อให้เมโธมิลความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม กับหนูขาวโดยฉีดเข้าทางช่องท้อง พบว่าในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเมโธมิลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม มีจำนวนไมโครนิวเคลียสใน polychromatic erythrocytes (PCEs) จำนวน 1,000 เซลล์เท่ากับ 14 และ 10 ในหนูขาวเพศผู้และเมียตามลำดับ (n=1) และในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเมโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม มีจำนวนไมโครนิวเคลียสเฉลี่ยเท่ากับ 24.3 ± 4.04 และ 18.0 ± 2.00 ในหนูขาวเพศผู้และเมียตามลำดับ (n=3)

พบว่าเมโธมิลที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสใน PCEs ได้เป็นจำนวนมากพอ ดังนั้นจึงใช้เมโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของเมโธมิล

3.1.2 เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดใบรางจืด

เมื่อให้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม กับหนูขาวทางปาก ซึ่งเป็นขนาดที่คำนวณจากขนาดที่ผู้บริโภคดื่มชารางจืดจริง ๆ ในหนึ่งวัน พบว่าใน polychromatic erythrocytes (PCEs) จำนวน 1,000 เซลล์ มีจำนวนไมโครนิวเคลียสเฉลี่ยเท่ากับ 5.33 ± 2.30 และ 8.00± 2.00 ในหนูขาวเพศผู้และเมียตามลำดับ (n=3) พบว่าสารสกัดใบรางจืดไม่มีผลทำให้จำนวนไมโครนิวเคลียสใน PCEs เพิ่มขึ้นทั้งในหนูขาวเพศผู้และเมีย เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างเดียว ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัมและความเข้มข้นที่ต่ำกว่าและสูงกว่าอีก 2 ขนาด คือ 50 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม แต่เนื่องจากขนาดดังกล่าวมีความเข้มข้นมากเกินไปที่จะป้อนให้หนูขาวได้ 1 ครั้งต่อวัน จึงแบ่งป้อนให้หนูขาว 2 ครั้งต่อวัน (เช้า-เย็น) ดังนั้นขนาดของสารสกัดใบรางจืดที่ให้ต่อวันคือ 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม

ผลการทดลองของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างเดียวเป็น negative control พบว่าใน polychromatic erythrocytes (PCEs) จำนวน 1,000 เซลล์ มีจำนวนไมโครนิวเคลียสเฉลี่ยเท่ากับ 4.00 ± 2.00 และ 6.66 ± 1.15 ในหนูขาวเพศผู้และเมียตามลำดับ (n=3) และหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ cyclophosphamide ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม เป็น positive control พบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ว่ามีจำนวนไมโครนิวเคลียสเฉลี่ยเท่ากับ 42.33 ± 2.51 และ 44.66± 12.22 ในหนูขาวเพศผู้และเมียตามลำดับ (n=3)

3.2 ผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของเมโธมิล

เนื่องจากผลการทดลองในหลอดทดลองพบว่าการให้สารสกัดใบรางจืดหลังจากเซลล์ได้รับเมโธมิลแล้วไม่สามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโธมิลได้ ดังนั้นในการทดสอบนี้จึงทำเฉพาะการให้สารสกัดใบรางจืดก่อนที่หนูขาวได้รับเมโธมิล โดยทำการฉีดเมโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัมเข้าทางช่องท้องของหนูขาวหลังจากป้อนสารสกัดใบรางจืดติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน

หนูขาวกลุ่มที่ฉีดเมโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม หลังจากได้รับสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสใน polychromatic erythrocytes (PCEs) ที่เกิดขึ้นได้ทั้งในหนูขาวเพศผู้และเมียเมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเมโธมิลเพียงอย่างเดียว และการต้านการเหนี่ยวนำของสารสกัดใบรางจืดเป็นแบบ dose-response คือจำนวนไมโครนิวเคลียสที่ลดลงมีการลดลงตามสัดส่วนของความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืดที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโธมิลได้ และหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเฉพาะสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม พบว่าสารสกัดใบรางจืดไม่มีผลทำให้จำนวนไมโครนิวเคลียสใน PCEs เพิ่มขึ้นทั้งในหนูขาวเพศผู้และเมีย เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างเดียว และจำนวนไมโครนิวเคลียสใน PCEs ที่ได้มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างเดียว รายละเอียดแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 19

สำหรับอัตราส่วนระหว่าง PCEs ต่อ PCEs+NCEs ของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม และเมโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม พบว่าอัตราส่วนระหว่าง PCEs ต่อ PCEs+NCEs ที่ได้ไม่ต่ำกว่า 20% ของอัตราส่วนระหว่าง PCEs ต่อ PCEs+NCEs ที่ได้ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่นอย่างเดียว โดย 20% ของอัตราส่วนระหว่าง PCEs ต่อ PCEs+NCEs ของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่นอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 0.1 และ 0.11 ในหนูขาวเพศผู้และเมียตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดและเมโธมิลไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว รายละเอียดแสดงในตารางที่ 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 แสดงผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของเมโธมิล ในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว

หนูขาว กลุ่มที่	สารทดสอบ (ความเข้มข้น)	%MNPCEs (เพศผู้)	%MNPCEs (เพศเมีย)	PCEs/PCEs+ NCEs (เพศผู้)	PCEs/PCEs+ NCEs (เพศเมีย)
1	น้ำกลั่น	0.84 ± 0.08	0.88 ± 0.22	0.50 ± 0.02	0.56 ± 0.06
2	CP (25 mg/kg b.w.)	4.48 ± 0.60***	4.32 ± 0.40***	0.35 ± 0.07	0.30 ± 0.05
3	methomyl (2 mg/kg b.w.)	3.16 ± 0.81**	2.00 ± 0.28**	0.47 ± 0.03	0.47 ± 0.03
4	RJ (25 mg/kg b.w.)	0.44 ± 0.23**	0.36 ± 0.21**	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.02
5	RJ (250 mg/kg b.w.)	0.44 ± 0.16**	0.54 ± 0.24	0.50 ± 0.05	0.48 ± 0.09
6	RJ (2,500 mg/kg b.w.)	0.68 ± 0.84	0.84 ± 0.08	0.40 ± 0.05	0.43 ± 0.03
7	RJ (25 mg/kg b.w.) + methomyl	1.88 ± 0.70*	1.32 ± 0.30**	0.48 ± 0.05	0.39 ± 0.07
8	RJ (250 mg/kg b.w.) + methomyl	1.20 ± 0.61**	0.80 ± 0.44**	0.47 ± 0.04	0.51 ± 0.05
9	RJ (2,500 mg/kg b.w.) + methomyl	0.84 ± 0.21***	0.64 ± 0.32***	0.49 ± 0.08	0.52 ± 0.06

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

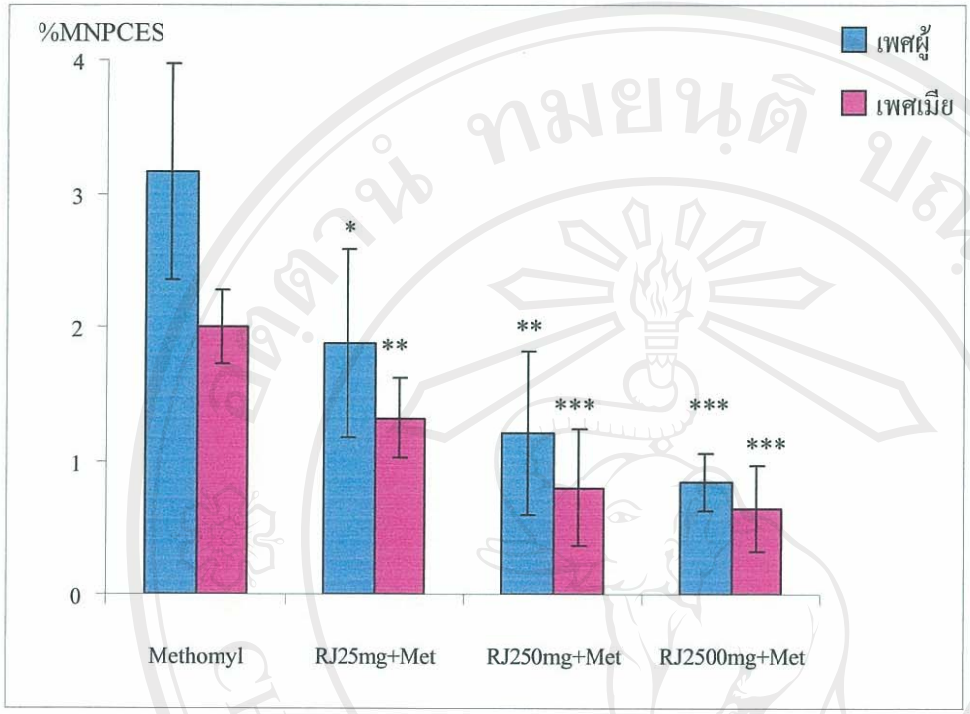
RJ = สารสกัดใบรางจืด

%MNPECs = จำนวนร้อยละของ polychromatic erythrocytes (PCEs) ที่พบไมโครนิวเคลียสต่อ PCEs จำนวน 1,000 เซลล์

PCEs/PCEs+NCEs = ดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์ไขกระดูก

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของหนูขาว 9 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศผู้และเมีย เพศละ 5 ตัว)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 19 เปรียบเทียบ %MNPCEs ของเซลล์ไขกระดูกหนูขาวเพศผู้และเมียที่ฉีดเมทโธมิลหลังจากได้รับสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ ติดต่อกัน 3 วัน

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Met = เมทโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม

RJ = สารสกัดใบรางจืด

%MNPCEs = จำนวนร้อยละของ polychromatic erythrocytes (PCEs) ที่พบไมโครนิวเคลียสจากการวิเคราะห์ PCEs จำนวน 1,000 เซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากสารฆ่าแมลงเมโธมิลในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ของคน เมื่อให้สารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งแบบ single dose และ double doses ก่อนที่เซลล์จะได้รับเมโธมิล โดยลดจำนวนไมโครนิวเคลียสที่เหนี่ยวนำด้วยเมโธมิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทดสอบการต้านการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว พบว่าสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม สามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสที่เหนี่ยวนำโดยเมโธมิลได้อย่างมีนัยสำคัญเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืดที่เพิ่มขึ้น โดยที่สารสกัดใบรางจืดในขนาดที่ทำการศึกษาไม่มีผลใด ๆ ต่อการทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ของคน และเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม หรือไม่มีสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แต่สามารถป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากสารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved