บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

แมลงศัตรูพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่สร้างความเสียหายให้แก่วงการเกษตร ทำให้พืชเศรษฐกิจมีปริมาณลดลงและด้อยคุณภาพ เกษตรกรจึงเลือกใช้สารเคมีสังเคราะห์กำจัดแมลงเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว แต่การใช้สารกำจัดแมลงเหล่านี้มักก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมา ซึ่งนอกจากจะใช้งบประมาณอย่างมหาศาลในการซื้อสารเหล่านี้จากต่างประเทศแล้ว ยาฆ่าแมลงยังก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพในคนและสัตว์อื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย และมีผลกระทบต่อระบบนิเวศในระยะยาวได้ ซึ่งปัญหาเหล่านี้ก็ยังคงทวีความรุนแรงอยู่ทั่วโลกดังจะเห็นได้จากรายงานที่มีมาอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงหรือบรรเทาปัญหาดังกล่าว การใช้สารกำจัดแมลงที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ เพราะผู้ใช้ส่วนใหญ่ล้วนมีความเชื่อว่าสารที่ได้จากธรรมชาตินั้นย่อมมีความปลอดภัยกว่าสารเคมีสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามเราจะเชื่อมั่นได้อย่างไรว่าสารที่ได้จากธรรมชาติจะมีความปลอดภัยจริง 100% งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากหนอนตายหยาก 2 ชนิด คือ *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ต่อหนูขาวเพศผู้ ซึ่งพบว่าสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดไม่ได้มีความปลอดภัยจริงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นในบทนี้จะได้อภิปรายถึงผลของสารสกัดเหล่านี้ต่อโครงสร้างและหน้าที่ของอวัยวะที่สำคัญ คือ ตับ ไต และสมองของหนูขาว โดยเน้นถึงผลต่อค่าชีวเคมีของเลือดและจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ ไต และสมอง

ค่าชีวเคมีที่บ่งชี้การทำงานของตับและไต

ตับและไตเป็นอวัยวะที่สำคัญในร่างกาย ซึ่งตับนอกจากจะมีหน้าที่ในการสร้างและเก็บสะสมสารชีวเคมีสำคัญต่างๆ แล้ว ยังทำหน้าที่ในการเมตาบอลิซึมสารต่างๆ หรือเปลี่ยนรูปของสารที่เป็นพิษให้มีพิษน้อยลงก่อนที่จะกำจัดออกนอกร่างกาย ส่วนไตเป็นอวัยวะที่มีบทบาทในการรักษาสมดุลของน้ำและเกลือแร่ ดูดกลับสารที่จำเป็น กำจัดสารที่ร่างกายไม่ต้องการ ตลอดจนกำจัดสารพิษที่ส่งผ่านมาจากตับออกนอกร่างกาย (Gaw *et al*., 1999; Wurochekke *et al*., 2008) ดังนั้นการตรวจสอบการทำงานของตับและไตจึงเป็นดัชนีชี้วัดที่ดีในการศึกษาถึงผลจากความเป็นพิษของสารต่างๆ ต่อร่างกาย งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบผลของสารสกัดรากหนอนตายหยากต่อหน้าที่และโครงสร้างของตับและไต โดยป้อนสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ที่ขนาด 300 และ 500 mg/kgBW ให้แก่หนูขาวเพศผู้เป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น แล้วทำการตรวจสอบค่าชีวเคมีคลินิกในซีรั่ม ผลการตรวจสอบค่าเคมีที่บ่งชี้การทำงานของตับพบว่า สารสกัดทั้งสองชนิด ทุกขนาดที่ใช้ ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า AST,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ALT และ ALP ให้แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 3) โดยค่าเหล่านี้ยังคงเป็นปกติและอยู่ในช่วงมาตรฐานของหนูทดลอง (Sharp and La Regina, 1998) ส่วนค่าของ BUN และ creatinine ในซีรั่มของหนูที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากทั้งสองชนิด ทุกขนาดที่ใช้ ก็มีค่าไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นเช่นกัน (ตาราง 3) โดยค่าทั้งสองยังอยู่ในช่วงของค่ามาตรฐานของหนูทดลอง (Sharp and La Regina, 1998) จากผลการวิจัยในครั้งนี้ก็แสดงให้เห็นว่าทั้งตับและไตยังคงทำงานเป็นปกติอยู่จึงทำให้ค่าของสารชีวเคมีเหล่านี้ยังคงอยู่ในช่วงของค่ามาตรฐาน ทั้งนี้มีรายงานว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดที่ใช้ป้อนให้แก่หนูในขนาดสูงๆ และให้เป็นเวลานานก็ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าชีวเคมีในตับและไต โดยตัวอย่างของพืชเหล่านั้น ได้แก่ *Semecarpus anacardium*, *Sida rhombifolia* Linn., *Momardica charantia*, *Phyllanthus emblica* Linn. และ *Morinda lucida* (Vijayalakshmi *et al*., 2000; Sireeratawong *et al*., 2008; Abalaka *et al*., 2009; Oduola *et al*., 2010; Jaijoy *et al*., 2010) เป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปว่าพืชสมุนไพรในขนาดที่ใช้มีความปลอดภัยต่อตับและไตของสัตว์ทดลอง

สำหรับเอนไซม์ transaminase (AST และ ALT) นั้นมีบทบาทในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน ซึ่งพบมากในเนื้อเยื่อตับ และนิยมใช้ชี้วัดความเสียหายของเซลล์ตับที่เกิดจากการได้รับสารพิษ โรคตับอักเสบและโรคตับแข็ง (Ranjna, 1999) นอกจากนี้ยังสามารถพบ AST ได้ในเนื้อเยื่อของหัวใจ กล้ามเนื้อลาย ไต และสมอง เป็นต้น (Collier and Bassendine, 2002; Aliyu *et al*., 2007) โดย AST จะอยู่ในเซลล์ส่วนไซโทพลาสซึมและ mitochondria แต่ ALT พบเฉพาะในไซโทพลาสซึม ส่วน ALP เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดของร่างกาย โดยพบมากสุดในเยื่อบุลำไส้ ท่อไต กระดูก และ ตับ ซึ่งใช้เป็นดัชนีชี้วัดความเสียหายของตับอันเนื่องมากจากการอุดตันของท่อน้ำดี (วัฒนา, 2545; Davern and Scharschmidt, 2002) ส่วน BUN และ creatinine เป็นสารชีวเคมีที่ใช้ตรวจสอบความผิดปกติของไตและภาวะไตล้มเหลวจากการได้รับสารพิษต่างๆ (Ashour *et al*., 2006; Gnanamani *et al*., 2008) เมื่อมีความเสียหายเกิดขึ้นในตับไม่ว่าสาเหตุใดก็ตามจะส่งผลทำให้ตับและไตทำงานได้ไม่เต็มที่ก่อให้สารชีวเคมีเหล่านี้รั่วไหลลงสู่กระแสเลือด จึงทำให้สามารถตรวจพบสารเหล่านี้ในปริมาณที่สูงกว่าค่าปกติในกระแสเลือด (Moss and Henderson, 1996; Gaw *et al*., 1999) การได้รับสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ มักส่งผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสารชีวเคมีของตับและไตในกระแสเลือด โดยมีรายงานว่าหนูที่ได้รับสาร malathion และ deltamethrin ในปริมาณเพียงเล็กน้อย มีสาร AST, ALT, ALP, BUN และ creatinine ในซีรั่มสูงกว่าระดับปกติ (Al - Attarm, 2010; El - Maghraby *et al*., 2010) นอกจากนั้นสาร lambda - cyhalothrin ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่ม pyrethroid ที่ความเข้มข้น 668 ppm ยังมีผลต่อหน้าที่ของไต โดยทำให้ค่า BUN และ creatinine ของหนูขาวเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับสารนี้นาน 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สัปดาห์ (Fetoui *et al*., 2010) ส่วนในพืชนั้นก็มีรายงานว่าก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าเอนไซม์ที่บ่งชี้การทำงานของตับและไตเช่นกัน โดย Mohajeri *et al*. (2007) และ Amna *et al*. (2011) พบว่าหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดจากพืช *Crocus sativus* L. และสารสกัดจากผักบุ้งฝรั่ง (*I. carnea*) มีค่าของสารชีวเคมีของตับและไตในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้พืชที่มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงหลายชนิดก็ได้มีรายงานถึงความเป็นพิษต่อการทำงานของตับและไตด้วยเช่นกัน โดย Al - Farwachi *et al*. (2008) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบยี่โถ (*Nerium oleander*) ในกระต่าย พบว่าสารสกัดขนาด 157.37 mg/kgBW ทำให้ค่า AST และ ALT ในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ภายหลังได้รับสารสกัดนานเพียง 4 วัน และหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดจากดอกสะเดา (*A. indica*) ที่ขนาด 750 และ 1,500 mg/kgBW เป็นเวลา 90 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของค่า AST, BUN และ creatinine (Kupradinum *et al*., 2010) ดังนั้นผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลของรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ที่ขนาด 300 และ 500 mg/kgBW ตลอดจนระยะเวลาในการศึกษานี้ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในหน้าที่ของตับและไตของหนูขาวเพศผู้

กิจกรรมของเอนไซม์ cholinesterase

ความผิดปกติจากการได้รับสารฆ่าแมลง เช่น ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน เหงื่อออก หายใจลำบาก กล้ามเนื้อชักกระตุก อาการเหล่านี้ล้วนสะท้อนถึงผลจากการทำงานที่ผิดปกติของระบบประสาท ดังนั้นการประเมินความเสียหายที่เกิดขึ้นในระบบนี้สามารถทำได้โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับหรือการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญในระบบประสาท ซึ่งเอนไซม์ ChE นั้นจัดว่าเป็น neurotoxic biomarker ที่สำคัญและนิยมนำมาใช้ประเมินความผิดปกติระบบประสาทอันเนื่องมาจากการได้รับสารพิษหรือยาฆ่าแมลง ถึงแม้ว่าหนอนตายหยากทั้งสองชนิดนี้ไม่มีผลทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในค่าชีวเคมีของเลือดที่บ่งชี้การทำงานของตับและไต แต่กลับพบว่ามีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ChE ทั้งชนิด AChE และ BuChE โดยสารสกัดรากหนอนตาย หยากทั้งชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ที่ขนาด 300 และ 500 mg/kgBW มีผลเพิ่มกิจกรรมของ AChE และ BuChE ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus ของหนูทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเห็นผลอย่างชัดเจนในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชนิด *S. aphylla* ขนาด 500 mg/kgBW (ตาราง 4 - 5 และภาพ 15 - 16 และ 19 - 20) นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของ AChE และ BuChE ในสมองทั้งสองส่วนของหนูที่ได้รับสารสกัดชนิด *S. aphylla* มีค่าเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารสกัดที่ใช้ ซึ่งกิจกรรมของ ChE ที่เพิ่มขึ้นนี้คล้ายคลึงกับในเนื้อเยื่อสมองของหนูที่ได้รับสารกำจัดแมลงหลายชนิด โดย Husain *et al*. (1996) และ Sayim *et al*. (2005) พบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สาร pyrethriod และ cypermethrin ทำให้กิจกรรมของ ChE ในสมองเพิ่มขึ้น และสาร deltamethrin มีผลทำให้กิจกรรมของ AChE เพิ่มสูงขึ้นในสมองส่วน frontal cortex, corpus striatum, hippocampus, cerebellum และ pons medulla ของหนูขาวและกระต่าย (Aziz *et al*., 2001)

ChE เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่สลาย ACh ให้กลายเป็น choline กับ acetate (Mukherjee *et al*., 2007) ที่บริเวณ cholinergic synapse (Taylor and Radić, 1994) ซึ่ง AChE นั้นพบมากในเนื้อเยื่อสมอง กล้ามเนื้อ และเม็ดเลือดแดง ส่วน BuChE นั้นพบมากในส่วนของตับ ปอด และซีรั่ม (Brimijoin, 1983; Chantonnet and Lockridge, 1989; Massoulie *et al*., 1999; Giacobini, 2002) ซึ่ง BuChE นั้นจะมีความจำเพาะในการสลาย choline ester น้อยกว่า AChE โดยนอกจากจะสลาย ACh แล้วยังมีบทบาทในการสลาย succinylcholine ได้อีกด้วย (Massoulie *et al*., 2002) จากกิจกรรมของเอนไซม์ ChE ที่เพิ่มขึ้นในสมองของหนูที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดรากหนอนตายหยากประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่ก่อให้เกิดพิษต่อในเนื้อเยื่อสมองโดยทำให้เกิดการหลั่งสาร ACh เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารออกฤทธิ์อาจมีเป้าหมายอยู่บริเวณประตูแคลเซียม (calcium channel) โดยกระตุ้นการเปิดของ calcium channel ทำให้ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์ไหลเข้าสู่ภายในเซลล์มากขึ้นอีกทั้งยังเพิ่มการหลั่งของ Ca^{2+} ที่เก็บสะสมอยู่ใน endoplasmic reticulum สู่ส่วนของ cytoplasm มากขึ้น ซึ่งปริมาณของ Ca^{2+} ที่มากขึ้นจะเพิ่มการหลั่ง ACh ออกสู่ synaptic cleft มากขึ้น จึงทำให้มีกิจกรรมของ ChE เพิ่มขึ้นตามมาเพื่อสลาย ACh เป็นการรักษาระดับของ ACh ในคงอยู่ในสภาวะสมดุลและป้องกันไม่ให้ ACh ที่มากเกินไปไหลลงสู่กระแสเลือด (Forehand, 2004) ดังมีรายงานว่าสาร ryanodine ที่สกัดได้จากพืช ryania และใช้เป็นสารกำจัดแมลงนั้นมีฤทธิ์ทำให้เกิดการหลั่ง ACh เพิ่มมากขึ้นโดยผ่านการกระตุ้นการเปิดของ calcium channel แบบผันกลับไม่ได้ (irreversible calcium release channel) เป็นผลทำให้เกิดการกระตุกของกล้ามเนื้อและอัมพาตในเวลาต่อมา (Bloomquist, 1993) นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากทั้งสองชนิดอาจจะเลียนแบบการทำงานของ ACh โดยแย่งจับกับ ACh - receptor (nicotinic หรือ muscarinic receptor) ในเนื้อเยื่อสมองก็เป็นได้ ทำให้ ACh ไม่สามารถจับกับ receptor ได้ จึงคั่งค้างอยู่ภายใน synaptic cleft มากขึ้นจึงทำให้ ChE ทำงานมากขึ้นเพื่อสลาย ACh บริเวณนี้มากขึ้น โดยสาร nicotine นั้นพบว่ามีฤทธิ์ในการเลียนแบบ ACh แย่งกับกับ nicotinic receptor ทำให้เกิดการสะสม ACh บริเวณ cholinergic synapses เกิดการกระตุ้นที่มากเกินพอเป็นผลทำให้เกิดการตื่นตกใจง่าย ชักกระตุก เป็นอัมพาตและตายในที่สุด (Bloomquist, 1993) ทั้งนี้ Schmeller *et al*. (1994) ได้ทำการศึกษาความสามารถของ quinolizidine alkaloids จากพืช *Lupinus albus*, L. mababilis และ *Anagyris foetida* ในการจับกับ ACh - receptor พบว่าสาร quinolizidine alkaloids ชนิด alpha - pyridones, N - methylcytisine และ cytosine นั้นมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสามารถสูงในการจับกับ nicotinic receptor ส่วน quinolizidine alkaloid อื่นๆ นั้นจะจับกับ muscarinic receptor สาร propane alkaloids หลายชนิดมีฤทธิ์ในการจับกับทั้ง nicoticnic และ muscarinic receptor ของ ACh ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้สารในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากพืชสายพันธุ์ *Iboga* นั้นยังมีรายงานว่า ออกฤทธิ์ในการขัดขวาง nicotinic receptor (Pace *et al*., 2004) และอัลคาลอยด์ที่ได้จากเห็ดชนิด *Amanita muscaria* นั้นยังออกฤทธิ์โดยเลียนแบบ ACh เพื่อจับกับ muscarinic receptor (Cuthbert, 2011) ดังนั้นจากรายงานดังกล่าวก็อาจจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม ChE ในเนื้อเยื่อสมองก็เป็นได้

สารกำจัดแมลงแม้ว่าจะมีผลทำให้กิจกรรมของ ChE ในเนื้อเยื่อสมองเพิ่มขึ้นแล้ว ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ ChE ในสมองอีกด้วย เช่น organophosphate, organochloride และ carbamate (Aygun *et al*., 2002; Ophardt, 2003; Mor and Ozmen, 2010) นอกจากนี้พืชหลายชนิดก็มีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง ChE ในสมองเช่นกัน โดยตัวอย่างของพืชเหล่านี้ได้แก่ *Galanthus nivalis*, *Eucharis amazonica* (E. x grandiflora), *Crinum powelli*, *Nerine bowdenii* (Rhee *et al*., 2003), *Solanum leucocarpum* Dunal, *Witheringia coccoloboides* (Damm) (Niño *et al*., 2006), *Arnica chamissonis* Less. spp. foliosa (Nutt.) Maguire และ *Ruta graveolens* L. (Wszelaki *et al*., 2010) เป็นต้น ซึ่งจากผลนี้แสดงให้เห็นว่าสารเคมีใดๆ ก็ตามที่มีฤทธิ์ในการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ChE ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลง ล้วนทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทด้วยกันทั้งสิ้น

เป็นที่น่าสนใจว่าสารสกัดเอทานอลจากรากหนอนตายหยากที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของ ChE ทั้งสองชนิดในเม็ดเลือดแดง โดยทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในเม็ดเลือดแดงของหนูกลุ่มควบคุม (ตาราง 4 - 5 และภาพ 18 และ 22) ซึ่งกิจกรรมของ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเม็ดเลือดแดงของหนูที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากทั้งสองชนิดทุกขนาดที่ใช้ ส่วน BuChE นั้นเห็นผลอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะกลุ่มที่ได้รับสารสกัด *S. aphylla* ขนาด 300 mg/kgBW เท่านั้น กิจกรรมที่ลดลงของเอนไซม์ ChE ในเม็ดเลือดแดงนี้อาจจะเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบมีผลทำให้เกิดการยับยั้งหรือลดการสังเคราะห์เอนไซม์นี้ลง ซึ่งสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ChE โดยการทำปฏิกิริยากับหมู่ serine hydroxyl บริเวณ active site ของเอนไซม์ และมีการเติมหมู่ phosphate ให้แก่หมู่ hydroxyl จากปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เอนไซม์นี้ไม่สามารถทำงานหรือสลาย ACh ได้ (ธวัช, 2554; Bloomquist, 1993) จึงทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้ลดลง ซึ่งกลไกนี้คล้ายกับพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphate และ carbamate ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ChE มีผลทำให้เกิดการสะสมของ ACh บริเวณ synaptic cleft และ neuromuscular junction ทำให้เกิดการชักกระตุกของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กล้ามเนื้อและเป็นอัมพาตในที่สุด (Vishwananthan and Srinivasan, 1964; Balali - Mood and Balali - Mood, 2008) สำหรับในรากหนอนตายหยากหลายชนิดนั้นได้มีรายงานว่าประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์ประเภทอัลคาลอยด์หลายชนิด จากการศึกษาองค์ประกอบในรากหนอนตายหยากชนิด *S. tuberosa* พบว่ามีสารอัลคาลอยด์ชนิด tuberostemoninol และ stemoninoamide เป็นองค์ประกอบสำคัญ (Lin *et al*., 1994) นอกจากนั้น Irie *et al*. (1970) ยังรายงานว่าในรากของ *S. japonica* นั้นประกอบไปด้วยสาร stemofolin เป็นจำนวนมาก ส่วนในรากของ *S. aphylla* นั้นก็ได้มีรายงานว่าประกอบไปด้วยสารอัลคาลอยด์หลายชนิด เช่น stemofoline, (2' *S*) - hydroxystemofoline, (11Z) - 1', 2' - didehydrostemofoline, stemaphylline, stemaphylline - N - oxide, stemofuran และ stilbostemin เป็นต้น (Mungkornasawakul *et al*., 2009; Sastraruji *et al*., 2011) ซึ่งสารอัลคาลอยด์เหล่านี้มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ChE ได้เป็นอย่างดี (Cardoso - Lopes *et al*., 2010) โดยการศึกษาของ (Choudhary *et al*. (2003) พบว่าสาร triperpenoid ที่เป็นอัลคาลอดย์ที่สกัดได้จากพืช *Buxus hyrcana* นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้ง AChE และ BuChE จากของกิจกรรม ChE ที่ลดลงในเม็ดเลือดแดงของหนูที่ได้รับสารสกัดหนอนตายหยากนี้ อาจเป็นไปได้ว่ามาจากฤทธิ์ของสารอัลคาลอยด์ที่มีอยู่ในรากพืชชนิดนี้ก็เป็นได้ นอกจากนี้การที่ในรากของหนอนตายหยากมีอัลคาลอยด์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบจึงมีฤทธิ์ในการกำจัดแมลง รวมถึงถูกนำไปใช้ในทางการแพทย์เพื่อบำบัดรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ ซึ่งพบว่ามีปริมาณของ ACh ในสมองน้อยกว่าคนปกติ

ส่วนผลจากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดรากหนอนตายหยากต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ChE ในซีรั่มนั้นพบว่า สารสกัดรากหนอนตายหยากทั้งสองชนิด ทุกขนาดที่ใช้ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE และ BuChE ให้แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม (ตาราง 4 - 5 และ ภาพ 17 และ 21) ซึ่งเหตุผลที่เป็นเช่นนี้ก็อาจเนื่องมากจากภายในซีรั่มนั้นมีปริมาณของเอนไซม์เหล่านี้น้อยกว่าในเนื้อเยื่ออื่นๆ และสารสกัดอาจจะมีความจำเพาะกับโมเลกุลของ AChE ที่แตกต่างกัน พบว่าในซีรั่มมี AChE ชนิดที่เป็น Globular subunit ในลักษณะที่เป็น G1 monomer ส่วนในเนื้อเยื่อสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นจะพบ AChE ชนิด G4 tetramer มากถึง 80 - 90% (Inestrosa *et al*., 1994) ส่วน AChE ในรูปแบบของ Asymmetric form นั้นจะพบมากบริเวณ synaptic cleft ของระบบประสาทรอบนอกและ neuromuscular junction ซึ่งยึดเกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ (Quinn, 1987; Chatonnet and Rockridge, 1989; Soreq *et al*., 1990; Kaufer *et al*., 1998; Shen *et al*., 2002; Darrhe-Shori, 2006; Soreq and Seidman, 2001) ดังนั้นจากผลของกิจกรรมของเอนไซม์ ChE ในเนื้อเยื่อสมองและเม็ดเลือดแดงที่แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง ก็อาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากมีฤทธิ์ที่จำเพาะต่อโมเลกุลของเอนไซม์ ChE ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แตกต่างกันในแต่ละอวัยวะก็เป็นได้ เมื่อเปรียบเทียบถึงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex, hippocampus, เม็ดเลือดแดงและซีรั่มแล้ว จะพบว่าในเนื้อเยื่อสมองมีกิจกรรมของเอนไซม์นี้มากที่สุด (ตาราง 4) ซึ่งเหตุผลที่เป็นไปได้ก็คือ AChE นั้นนอกจากจะมีหน้าที่ในการสลาย ACh ยังคาดว่าน่าจะมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของระบบประสาท (Robertson and Yu, 1993; Layer and Willbold, 1995) โดยมีบทบาทในการเจริญของ axon และการสร้าง synapse ของเซลล์ประสาท (Sternfeld *et al*., 1998; Bigbee *et al*., 2000) การยึดเกาะกันของเซลล์ (cell adhesion) (Bigbee and Sharma, 2004) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ประสาท (neuronal migration) (Byers *et al*., 2005; Dori *et al*., 2005) จึงทำให้พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้มากกว่าที่พบในเนื้อเยื่อของเม็ดเลือดแดง และซีรั่ม

เนื้อเยื่อวิทยาของตับ ไต และสมอง

การศึกษาผลของสารสกัดรากหนอนตายหยากต่อค่าชีวเคมีที่บ่งชี้การทำงานของตับ ไต และสมองเพียงอย่างเดียว ก็อาจยังไม่เพียงพอที่จะยืนยันได้ว่าไม่ได้มีความเสียหายเกิดขึ้นในอวัยวะเหล่านี้ เพราะยังคงมีการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีบางชนิดอยู่ เช่น การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ChE ในเนื้อเยื่อสมองและเม็ดเลือดแดง และถึงแม้ว่าจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงในค่าชีวเคมีที่บ่งชี้การทำงานของตับและไต แต่ก็ไม่อาจยืนยันได้ว่าอวัยวะเหล่านี้จะไม่ได้รับความเสียหายในระดับเนื้อเยื่อ ดังนั้นการตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหล่านี้จึงยังคงเป็นสิ่งจำเป็น และจากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้ทั้งชนิด *S. aphylla* และ *Stemona* sp. ทุกขนาดที่ใช้ มีผลทำให้เกิดความเสียหายในเนื้อเยื่อตับที่คล้ายคลึงกัน โดยพบว่าเกิดการอักเสบอย่างอ่อน คือ มีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes infiltration) รอบๆ hepatic triad และมีเลือดออก (haemorrhage) แทรกอยู่ตาม hepatic sinusoid (ภาพ 23) จากลักษณะทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในเนื้อตับของหนูทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ตับอาจมีกลไกในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือสารพิษที่เข้ามาโดยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งกลไกนี้เริ่มจากมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณหลอดเลือด ทำให้มีการเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากภายในหลอดเลือดออกสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย (สุรพันธ์, 2554) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือสารพิษต่างๆ จึงปรากฏเห็นว่ามีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่รอบๆ ของหลอดเลือด อีกทั้งยังพบว่าการสะสมของ amyloid ในเนื้อเยื่อตับอาจทำให้เกิด haemorrhage ได้เช่นกัน (Pepys, 1993) นอกจากนี้สารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* ที่ขนาด 300 และ 500 mg/kgBW ยังทำให้เกิดความเสียหายในเนื้อเยื่อไตของหนู โดยพบการหดตัวของ glomerulus การขยายตัวของท่อไต ตลอดจนทำให้เกิดการอักเสบ คือ มีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวรอบๆ หลอดเลือด (ภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

24) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *Stemona* sp. ทุกขนาดที่ใช้นั้นพบว่ามีความเสียหายเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อไต คือ เกิดการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวกระจายรอบหลอดเลือดและท่อไต มีการหดตัวของ glomerulus และมีการเกิดเลือดคั่ง (ภาพ 25) โดยไตนั้นเป็นอวัยวะที่มีบทบาทในการกรองของเสียและดูดกลับสารที่จำเป็นการขับออกนอกร่างกาย ประกอบไปด้วยส่วนของ renal corpuscle, proximal convoluted tubule, loops of Henle, distal convoluted tubule เป็นต้น ซึ่ง renal corpuscle นั้นภายในจะประกอบไปด้วยกระจุกของเส้นเลือดฝอยและล้อมรอบไปด้วยชั้นของ epithelial cell เรียกว่า Bowman's capsule ส่วน convoluted tubules นั้นประกอบไปด้วย simple cuboidal หรือ columnar epithelium (Scanlon and Sanders, 2007) ลักษณะของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อไตของหนูขาวนี้ล้วนแสดงให้เห็นถึงการอักเสบอันเนื่องมาจากการได้รับสารสกัด ซึ่งพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับท่อไต และ glomerlus นั้นล้วนทำให้ไตสูญเสียหน้าที่ไปหรือทำหน้าที่ไม่เต็มที่ โดยผลความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้คล้ายคลึงกับการรายงานของ Amole and Izegbu (2005) ที่พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจากพืช *Chenopodium ambrosioides* ขนาด 12.31 - 31.89 g/kgBW เป็นเวลา 42 วัน มีผลทำให้เกิดการแทรกซึมเซลล์เม็ดเลือดขาวและเกิดการคั่งตัวของเลือดภายในหลอดเลือด อีกทั้งสาร paraquat ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชนั้นยังทำให้เกิดการขยายตัวและการคั่งของเลือดภายใน renal vein เกิดการหลุดลุ่ยของท่อไตจากส่วนของ basement membrane มีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาว และ glomerulus บางส่วนได้รับความเสียหายในเนื้อเยื่อไตของหนูขาว (Lamfon and Al - Rawi, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำมันจากราก *Cedrus deodara* ทำให้เกิดการหดตัวของ glomerulus และมีเลือดออกใน renal corpuscle ตลอดจนมีการหดตัวของ glomerulus epithelium ในเนื้อเยื่อไต และทำให้เกิดการขยายตัวของ central vein และการคั่งตัวของเลือดในหลอดเลือดในเนื้อเยื่อตับของหนูขาว (Parveen *et al*., 2010) นอกจากนั้น สารสกัดจากใบสะเดาที่ขนาด 1,000 และ 2,000 mg/kgBW ยังทำให้เกิดการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวและการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเนื้อเยื่อตับและการคั่งตัวของเลือดภายใน glomerulus ภายหลังได้รับสารนี้นาน 28 วัน (Katsayal *et al*., 2008) ดังนั้นการที่มีความเสียหายเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อตับและไตก็จะส่งผลทำให้การทำงานของตับและไตลดลดด้วยเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษานี้กลับพบว่า ถึงแม้จะมีความเสียหายเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของอวัยวะเหล่านี้ แต่ค่าของสารชีวเคมีที่บ่งชี้การทำงานของตับและไตยังคงเป็นปกติและอยู่ในช่วงของค่ามาตรฐานของหนูทดลองอยู่ ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าจุลพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นนี้เป็นเพียงความเสียหายในเบื้องต้นเท่านั้นและไม่ถึงระดับที่ก่อให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ไป จึงทำให้ค่าของสารชีวเคมีเหล่านั้นยังคงเป็นปกติอยู่ ซึ่งยังคงมีรายงานที่คล้ายคลึงกับการศึกษานี้อยู่ โดยพบว่าหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากกวาวเครือขาวที่ขนาด 400, 600 และ 800 mg/kgBW นาน 4 สัปดาห์ ถึงแม้จะว่าจะมีการเพิ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนของเซลล์บริเวณรอบๆ Bowman's capsule มีการเรียงตัวที่ผิดปกติของ hepatic sinusoid และมีการสะสมของ vacuole ในเซลล์ตับ แต่ก็ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่าของ AST, ALT, BUN และ creatinine ให้ต่างไปจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด (ไพฑูรย์, 2545)

สำหรับการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อสมองหนูที่ได้รับสารสกัดรากหนอนตายหยากนั้นพบว่า หนูที่ได้รับสารสกัดหนอนตายหยากทั้งสองชนิด ทุกขนาดที่ใช้นั้นไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อสมอง โดยในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex นั้นมีการเรียงตัวของชั้นเซลล์ที่เป็นปกติ แต่ละชั้นประกอบไปด้วยเซลล์ประสาท (neuron) และเซลล์ค้ำจุนเซลล์ประสาท (neuroglia) ที่เป็นปกติ เซลล์ประสาทมีนิวเคลียสกลม ภายในบรรจุเส้นใยโครมาตินที่ย้อมติดสีเข้ม neuroglia มีขนาดกว่าเซลล์ประสาท นิวเคลียสติดสีเข้มชัดเจน (ภาพ 26 และ 27) ส่วนในเนื้อเยื่อสมองส่วน hippocampus นั้นยังคงมีรูปแบบการเรียงตัวของเซลล์ประสาทที่เป็นปกติในส่วนของ CA1, CA2 และ CA3 ตลอดทั้งในส่วนของ dentate gyrus (ภาพ 28 และ 29) เหตุที่เนื้อเยื่อสมองยังคงเป็นปกติอยู่ก็อาจจะเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบของพืชทั้งสองชนิดไม่สามารถที่ผ่านสิ่งป้องกันสมองหรือ blood brain barrier (BBB) ในสมองได้ง่าย (Stegelmeier *et al*., 2003) ซึ่ง BBB นี้เป็นกลไกทางสรีรวิทยาที่ป้องกันไม่ให้สารพิษหรือสารเคมีอันตรายต่างๆ ผ่านเข้าไปในเซลล์สมองได้ง่าย BBB นั้นมีโครงสร้างประกอบด้วยชั้นของผนังเซลล์ของหลอดเลือดฝอยหรือ endothelial cells ที่อยู่ชิดกันมาก และมีแขนงของ astrocyte พันอยู่รอบๆ ซึ่งโครงสร้างนี้สามารถกั้นสารโมเลกุลใหญ่ไม่ให้ ผ่าน BBB แต่สารโมเลกุลเล็กบางชนิด เช่น oxygen, carbon dioxide และ steroid hormones บางตัวสามารถผ่าน BBB ได้โดยละลายผ่านไขมันที่ประกอบเป็นผนังเซลล์ สารบางชนิด เช่น น้ำตาลและกรดอะมิโน ก็สามารถผ่านได้เนื่องจากมีระบบขนส่งพิเศษ (Vries and Prat, 2005) แต่อย่างไรก็ตามถ้าหากว่าสารใดๆ สามารถผ่าน BBB ได้ก็อาจไปสร้างความเสียหายให้กับเนื้อเยื่อสมอง ดังมีรายงานว่าสาร chlopyrifos และ cypermethrin มีผลทำให้เกิดการตายแบบ pyknosis ของเซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อสมองส่วน hippocampus และ cerebral cortex ภายหลังได้รับสารนี้ที่ขนาด 27.8 และ 2.7 mg/kg BW ตามลำดับ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์โดยการซึมผ่านทางผิวหนัง (Latusayńska *et al*., 2001) นอกจากนั้นสาร cypermethrin ที่ขนาด 60, 150 และ 300 mg/kgBW ยังมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์สมองแบบ pyknosis และทำให้เซลล์สมองขาดเลือดภายหลังจากได้รับสารนี้โดยการกินนาน 28 วันอย่างต่อเนื่อง (Sayim *et al*., 2005) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าขนาดของสารสกัดรากหนอนตายหยากที่ใช้ในการศึกษานี้อาจจะยังไม่มากพอที่จะสามารถซึมผ่าน BBB และไปมีผลทำให้เกิดความเสียหายในเนื้อเยื่อสมองได้

จากผลการวิจัยนี้ที่ได้แสดงมาแล้วข้างต้น ก็แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลจากรากหนอนตายหยากก็ไม่ได้มีความปลอดภัยเพียงพอต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและอาจจะไม่เหมาะสมที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะนำไปผลิตเป็นสารชีวภาพกำจัดแมลงที่มีความปลอดภัย ดังจะเห็นได้จากดัชนีที่บ่งชี้ถึงความเสียหายต่างๆ ในอวัยวะสำคัญ คือ ตับ ไต และสมอง ซึ่งถ้าหากว่าจะนำไปใช้จริงในการกำจัดแมลงนั้นก็อาจจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปถึงสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะกับแมลงศัตรูพืช และแยกสกัดเอาเฉพาะสารที่สำคัญออกไปใช้ประโยชน์ โดยสารนั้นต้องไม่มีผลที่ทำให้เกิดพิษหรือมีพิษน้อยที่สุดต่อสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมาย รวมไปถึงไม่ก่อให้เกิดการสะสมในระบบนิเวศด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved