ผลของสารสกัดรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) ต่อการทำงานของไซโตโครมพี 450 พีไกลโคโปรตีน และการขับออกของมาลาไธออนใน everted intestine

วรรณา ศิริแสงตระกูล*, พลอยไพลิน แก้วบุญเรือง, วัชระ ดุลยาสิทธิพร

หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) สมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณในการต้านพิษจากสารพิษ และสารกำจัดแมลง แต่ความเข้าใจในกลไกการลดพิษยังมีจำกัด การวิจัยนี้ศึกษาผลของรางจืดสกัดน้ำ (TBA) ต่อการทำงานของไซโตโครมพี 450 (CYP) พีไกลโคโปรตีน (P-gp) และการขับออกของมาลาไธออน (Malathion)ในหนูแรทที่ป้อน TBA ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 g/kg bw เป็นเวลา 28 วัน แล้วนำตับเพื่อมาวัดการทำงานของ CYP และส่วนของลำไส้เล็ก (ileum) เพื่อเตรียมเป็น everted intestine สำหรับวัดการทำงานของ P-gp และการขับออกของมาลาไธออน ผลวิจัยพบว่า TBA (0.5-2.0 g/kg bw) มีผลยับยั้งการทำงานของ CYP1A1, CYP2B และ CYP3A4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามความเข้นข้นที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของ CYP1A2 และมีผลต่อการทำงานของ P-gp เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบความสัมพันธ์เชิงลบเมื่อความเข้มข้นของ TBA เพิ่มขึ้น การทำงานของ P-gp ใน everted intestine ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และลดการขับออกของมาลาไธออนเป็น 0.78- 0.54 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลวิจัยชี้ให้เห็นว่ากลไกการลดพิษของรางจืดอาจเกี่ยวกับการยับยั้งการทำงานของ CYPs ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ bioactivation ของของสารพิษในร่างกาย และกระตุ้นการขับออกของสารผ่านการชักนำการทำงานของ P-gp แต่การชักนำดังกล่าวอาจไม่เกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษของมาลาไธออน ในส่วนของกลไกของรางจืดต่อการลดความเป็นพิษจากสารต่างๆ ในลักษณะ in vivo เป็นเรื่องสำคัญและควรจะต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: รางจืด ไซโตโครมพี 450 พีไกลโคโปรตีน มาลาไธออน ออร์กาโนฟอสเฟต

***ผู้รับผิดชอบบทความ**

ดร.วรรณา ศิริแสงตระกูล

หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail: wannas@kku.ac.th

Effect of *Thunbergia laurifolia* Lindl. on Cytochrome P450 and P-glycoprotein Activity and The Efflux of Malathion in Everted Intestine

Wanna Sirisangtragul*, Ploypailin Kaewboonraung, Watchara Dulyasittiporn

Forensic Science Program, Faculty of Science, KhonKaen University

Abstract

Thunbergia laurifolia Lindl. is a Thai herbal medicine that has long been used as an antidote for toxic substances and insecticides. However, understanding of its mechanism of detoxification is insufficient. This research investigated the effects of aqueous extracts of *T. laurifolia* Lindl. (TBA) on cytochrome P450 (CYP), P-glycoprotein (P-gp) activity, and the efflux of malathion. Male Sprague-Dawley rats were orally administered TBA at doses of 0.5, 1.0, and 2.0 g/kgBW for 28 days. The livers were then collected for examination of the CYP activity, and everted intestines were prepared from the small intestines (ileum) for P-gp activity analysis and the efflux of malathion. The administration of TBA (0.5-2.0 g/kgBW) significantly inhibited CYP1A1, CYP2B, and CYP3A4 activities as dose dependent manner. Notably, the CYP1A2 activity was unaltered. The change in P-gp activity was found in the TBA treated group in comparison with the control group. However, an inverse correlation was observed in the everted intestines. Increased concentrations of TBA significantly decreased P-gp activity. Moreover, the efflux of malathion was reduced to 0.78- 0.54 times when compared to the control group. Our results indicated that the detoxification mechanism of *T.laurifolia* Lindl. might relate to the inhibition of relevant CYPs involved in the bioactivation of toxic substances in the body, and stimulate the excretion of toxic compounds via the induction of P-gp activity. However, the induction of P-gp may not be a contributing factor to malathion detoxification. Further study related to the concomitant exposure of toxic substances and *T.laurifolia* Lindl *in vivo* will be required.

Keywords: *Thunbergia laurifolia* Lindl., Cytochrome P450, P-glycoprotein, Malathion, Organophosphate

***Coresponding auther**

Wanna Sirisangtragul, Ph.D

Forensic Science Program, Faculty of Science, Khonkaen University

E-mail: wannas@kku.ac.th

บทนำ

กระบวนการ biotransformation ของสารที่เข้าสู่ร่างกาย จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ xenobiotic metabolizing enzyme เช่น cytochrome P450 (CYPs) โดยกระบวนนี้มีความสำคัญกับการเมทาโบลิสมของสาร ที่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดความเป็นพิษ ประสิทธิภาพของยา หรือความสามารถในการก่อมะเร็งของสารเคมีได้ สารเคมี สารก่อมะเร็ง รวมทั้งสารกำจัดศัตรูพืชบางชนิด เมื่อผ่านกระบวนการเมทาโบลิสม (Bioactivation) สารอาจถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงขึ้น[1,2] ส่งผลต่อความรุนแรงของการเกิดพิษในร่างกาย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ที่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดความเป็นพิษของสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ transporter proteins ได้แก่ P-glycoprotein (P-gp) เป็นโปรตีนในกลุ่ม ATP-binding cassette superfamily ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการผ่านเข้า-ออกเซลล์ของสารต่างๆ และการขับออกของสาร เพื่อป้องกันการสะสมของสารพิษในเซลล์ มีรายงานการศึกษาว่าการยับยั้งการทำงาน ATPase pump และ P-gp เช่น ในสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates) เช่น คลอร์ไพริฟอสเมทิล (Chloryriphosmethyl) และไดคลอวอส (Dichlorvos) มีผลทำให้มีการสะสมของสารในเซลล์ และเพิ่มความเป็นพิษสูงขึ้น[3,4] ในทางตรงกันข้ามพบว่า ภาวะการดื้อสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมทในหนอนแมลงจากการ over expression ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ P-gp ทำให้การขับออกของสารเคมีเพิ่มขึ้น จึงลดความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงลงได้[5,6] และเป็นที่ทราบดีว่าสารตั้งต้น (Substrate) หรือสารยับยั้งการทำงานของ P-gp หลายๆ ชนิดมักเป็นสารตั้งต้นของ CYPs ด้วยเช่นกัน เช่นมาลาไธออน (Malathion) เป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ที่มีอัตราการใช้สูงถึง 15 ล้านตันต่อปีในกลุ่มเกษตรกร ทำให้มีโอกาสได้รับพิษจากสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มนี้สูงกว่าจากสารเคมีประเภทอื่น และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยการเกิดพิษนั้นพบได้ทั้งพิษแบบเฉียบพลันที่มีสาเหตุจากอุบัติเหตุ หรือเจตนาทำร้ายตนเอง และพิษแบบเรื้อรัง[7] มาลาไธออนเมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกาย จะเข้าสู่กระบวนการ bioactivation ที่ตับโดยการทำงานของ cytochrome P450 ชนิด CYP1A2, CYP2B6 และ CYP3A4[8] และถูกเปลี่ยนไปเป็น toxic metabolite ที่เรียกว่า มาลาออกซอน (Malaoxon) ที่มีความเป็นพิษสูงขึ้นถึง 10-30 เท่า เมื่อได้รับโดยการกินโดยสารตัวกลางนี้ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งเป็นกลไกหลักที่ก่อให้เกิดพิษต่อระบบประสาท และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต[9,10] การเหนี่ยวนำหรือยับยั้งการทำงานของ CYPs และ P-gp นอกจากพบในสารเคมี และยาแล้ว ยังมีรายงานว่าสารสำคัญกลุ่ม flavonoid และ coumarin ที่พบในพืช ผัก ผลไม้ก็สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ CYPs และ P-gp ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งการชักนำหรือการยับยั้งการทำงานดังกล่าว สามารถส่งผลต่อ pharmacokinetics, pharmacodynamics และ bioavailability ของยาและ/หรือสารเคมี และอาจเพิ่มหรือลดความเป็นพิษของสารดังกล่าวได้[11, 12]

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) เป็นพืชสมุนไพรไทย ที่มีสรรพคุณแก้พิษเบื่อเมา

และต้านพิษสารกำจัดแมลงบางกลุ่ม มีรายงานการวิจัยในสัตว์ทดลองและคน ว่ารางจืดมีฤทธิ์ลดความเป็นพิษของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ โดยสารสกัดรางจืดสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ AChE และ quinone reductase (QR) แต่ความสามารถในการลดความเป็นพิษขึ้น อยู่กับช่วงเวลาของการให้รางจืด โดยการให้รางจืดหลังการได้รับสารพิษทันทีจะสามารถลดความเป็นพิษได้ดี [13-17] รางจืดในรูปแบบชา หรือใบสดต้มน้ำดื่ม สามารถลดระดับสารกำจัดศัตรูพืชในร่างกายสู่ระดับปลอดภัย โดยพิจารณาจากระดับ AChE ในเลือด และเห็นผลได้ในการให้รางจืดหลังการได้รับสารพิษทันที หรือในระยะเวลา 7 หรือ 21 วันหลังการกิน ในประเทศไทยนั้นรางจืดได้รับการบรรจุเข้าสู่บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2554 ในส่วนของยาที่พัฒนามาจากสมุนไพรของเภสัชตำรับโรงพยาบาล และส่งเสริมให้เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการถอนพิษแก้เบื่อเมา เสริมสุขภาพในด้านโภชนบำบัดทดแทนการใช้ยาสังเคราะห์[18-20] และได้มีการผลิตและจัดจำหน่ายในท้องตลาดอย่างแพร่หลายทั้งชนิดแคปซูล และรูปแบบชาผง แต่ห้ามใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหาร รวมทั้งเครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จากการศึกษาความเป็นพิษในหนูขาว ด้วยการให้รางจืดขนาดสูง (10 g/kg bw) เพียงครั้งเดียว หรือการให้ในปริมาณเทียบเท่าการดื่มชาในคนทุกวัน (500 mg/kg bw) ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 28 วัน ไม่พบการตาย และความผิดปกติของอวัยวะภายใน ยกเว้นค่าน้ำหนักของตับ ไต และการเปลี่ยนแปลงของตัวชี้วัดบางส่วนในเลือด รวมทั้งลดการเกิด lipid peroxidation ในหนูเพศผู้ [21] ส่วนการได้รับรางจืดในระยะยาว (ปริมาณ 20-2000 mg/kg bw) ไม่พบการตาย หรือการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของสุขภาพโดยรวมในหนูที่ทำการทดลอง แต่มีข้อแนะนำถึงการได้รับปริมาณสูงในระยะยาวอาจส่งผลกระทบต่อระบบระบบเลือดได้ [22] ในขณะที่กลไกการลดพิษของรางจืดนั้นยังมีการศึกษาอยู่อย่างจำกัด เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการเพิ่มหรือลดความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ในประเด็นของการดูดซึมหรือการขับออกของสารในทางเดินอาหาร ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ P-gp และกระบวนการ biotransformation โดยการทำงานของ CYP1A2, CYP2B6 และ CYP3A4[8] ที่เปลี่ยนมาลาไธออนไปเป็นสารเมทาโบไลท์มาลาออกซอน ซึ่งอาจจะทำให้มีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น และจากที่ทราบกันดีว่า พืชสมุนไพรหลายชนิดก็สามารถชักนำหรือยับยั้งการทำงานของ CYPs และ P-gp ได้เช่นกัน ดังนั้นการชักนำหรือการยับยั้งการทำงานของ CYPs หรือ P-gpโดยพืชสมุนไพร จึงน่าจะเป็นกลไกหนึ่งที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นพิษของสารเคมีหรือสารกำจัดแมลงได้ การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของสารสกัดรางจืดสกัดน้ำต่อการทำงานของ CYPs ในตับหนูแรท และผลต่อการทำงานของ P-gp รวมทั้งการขับออกของมาลาไธออนใน everted intestine (*ex vivo*) การศึกษาดังกล่าวจะทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของรางจืด ซึ่งจะเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้รางจืดในการแก้พิษเบื่อเมา ส่งเสริมความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและสร้างมูลค่าเพิ่มแก่สมุนไพรไทยได้อีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของรางจืดสกัดน้ำ (Aqueous extract of *Thunbergia laurifolia* Lindl.; TBA) ต่อการทำงานของไซโตโครมพี 450 (CYPs) ในตับหนูแรท และผลต่อพีไกลโคโปรตีน (P-gp) และการขับออกของมาลาไธออนใน everted intestine

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมี Acetonitrile และ methanol เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Honeywell (USA) dimethyl sulfoxide ของ Fisher Scientific (England) สาร 6-β-hydroxytestosterone, ethoxyresorufin (ER), bovine serum albumin (BSA), methoxyresorufin (MR), dithiotrietol (DTT), malathion, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), resorufin, sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$), rhodamine 123 และ verapamil เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma Chemical Co. (USA), สาร potassium chloride, potassium dihydrogen-phosphate, di-sodium hydrogenphosphate, calcium chloride dehydrate, magnesium chloride hexahydrate และ sodium chloride เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท BDH (England)

การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดสารสำคัญ

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) รวบรวมจากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น จัดจำแนกอ้างอิงตามการศึกษาของเต็ม สมิตินันทน์ (2544)[23] ใบรางจืดที่ได้นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้หมาด แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C (Memmert, USA) ก่อนนำมาบดให้ละเอียด และสกัดสารสำคัญด้วยการแช่ในน้ำต้มเดือด (100 g/L) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1) แล้วนำไปประเหยแห้งด้วย freeze dryer (Labogene™Denmark) จนแห้งสนิท นำสารรางจืดสกัดน้ำ (aqueous extract of *Thunbergia laurifolia* Lindl.; TBA) ที่ได้ yield ประมาณร้อยละ 20.01 ของน้ำหนักเริ่มต้น เก็บในภาชนะทึบแสงที่อุณหภูมิ 4ºC เพื่อการใช้การศึกษาต่อไป

สัตว์ทดลอง

หนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dewley อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 275 ± 25 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงภายใต้การควบคุมอุณหภูมิห้องที่ 25 ± 2 °C ในสภาพที่มีแสง 12 ชั่วโมงและปราศจากแสง 12 ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำตลอดเวลา

การศึกษาผลของสารรางจืดสกัดน้ำต่อการทำงานของ CYPs และ P-gp

ความเข้มข้นของ TBA ที่ใช้ในการป้อน 0.5, 1.0 และ 2.0 g/kg bw ตามลำดับ หรือเทียบเท่ากับขนาดในการบริโภครางจืดชนิดชาซอง ขนาด 0.5, 1 และ 2 กรัม วันละ 3 ครั้ง [21]

แบ่งหนูแรท ออกเป็น 4 กลุ่ม (n= 7) ป้อนสารสกัดโดยวิธี gavage ปริมาตรในการป้อนไม่เกิน 3 ml คำนวณตามขนาดน้ำหนักตัว เริ่มทำการป้อนหนูในเวลา 8.30 น. ของทุกวัน เป็นเวลา 28 วัน

กลุ่ม 1: กลุ่มควบคุม จะได้รับการป้อนน้ำกลั่น (vehicle)

กลุ่ม 2-4 : กลุ่มทดสอบ จะได้รับการป้อนสารสกัดรางจืดสกัดน้ำละลายในน้ำที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 g/kg bw ตามลำดับ

เมื่อครบกำหนด งดอาหารสัตว์ทดลองแต่ให้ดื่มน้ำเป็นปกติเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการเตรียมทำให้หนูแรทสลบลึกด้วย diethyl ether ทำการเปิดหน้าท้อง แล้ว perfuse ด้วย ice-cold normal saline เพื่อล้างตับจนมีสีน้ำตาลออกเหลือง แยกเก็บตับแช่ลงใน liquid nitrogen ทันทีก่อนทำการเก็บรักษาที่ตู้ -80°C เพื่อใช้ในการเตรียม hepatic microsome และเก็บลำไส้เล็กส่วน ileum ขนาดความยาว 30 cm นำมาล้างด้วย ice-cold normal saline จนสะอาดเพื่อใช้ในการเตรียมถุงลำไส้กลับด้านของหนูแรท (everted intestine) ต่อไป งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตามเอกสารเลขที่ AEKKU 68/2556

การเตรียม hepatic microsome

เริ่มด้วยการนำตับมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ตามด้วยการ homogenized ใน ice cold 1.15% (w/v) KCL ที่เตรียมใน 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:3 จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 9000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที (Kubota 3740, Japan) ครบเวลา นำตัวอย่างมาแยกเก็บ supernatant เพื่อนำไป ปั่นเหวี่ยงต่อที่ 100,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Sorval ultrapro™ 80, USA) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาแยกเก็บชั้น sediment แล้วนำมา resuspension ด้วย 0.1 M of potassium phosphate pH 7.4 ที่เติม 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA และ 0.1 mM dithiotrietol จากนั้นนำตัวอย่าง hapatic microsome ที่ได้แบ่งเก็บในหลอดทดลองขนาด 1 ml และเก็บรักษาที่ตู้ -80°C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป โปรตีนใน hapatic microsome วิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry[24] โดยใช้ BSA เป็นสารมาตรฐาน และปรับปริมาณโปรตีนใน hepatic microsomal ความเข้มข้นสุดท้ายให้มีค่าระหว่าง 10-20 mg/ml

การตรวจวัดการทำงานของ CYPs

การทำงานของเอ็นไซม์ CYP1A1, CYP1A2 และ CYP2B เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา alkoxyresorufin *O*-dealkylation (AROD)[25,26] โดยวัดจากการทำงานของเอ็นไซม์ ethoxyresorufin *O*-dealkylase (EROD), methoxyresorufin *O*-dealkylase (MROD) และ penthoxyresorufin *O*-dealkylase (PROD) โดยข้อมูลที่ได้แสดงถึง การทำงานของเอ็นไซม์ CYP1A1, CYP1A2 และ CYP2B ตามลำดับ โดยตรวจติดตามการเพิ่มของผลภัณฑ์ resorufin ด้วยเครื่อง spectrofluorometer (SpectraMax M5, Molecular Devices, USA) ที่ความยาวคลื่น 530 (excitation) และ 580 nm (emission) ตามลำดับ การทำงานของเอ็นไซม์แสดงเป็น nmol/min/mg protein

การทำงานของเอ็นไซม์ CYP3A4 ตรวจวัดด้วยปฏิกิริยา Testosterone hydroxylation โดยใช้ testosterone เป็นสารตั้งต้น[27] และสารเมทาโบไลท์ 6 β-hydroxytestosterone ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาสกัดแยกด้วย ethyl acetate แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วย reverse phase-HPLC และ UV detector ที่ความยาวคลื่น 540 nm. หน่วยการทำงานของเอ็นไซม์ CYP3A4 แสดงเป็น nmol/min/mg protein

การเตรียม everted intestine

Everted intestine เตรียมตามวิธีของ Daodee *et al*. (2007)[28] โดยนำลำไส้เล็กส่วน ileum (30 cm) ที่ล้างด้วย ice-cold normal saline จนสะอาด ตัดแบ่งออกเป็นส่วนๆ ขนาดความยาว 10 cm ทำการพลิกกลับลำไส้ (evert) ผูกปลายด้านล่างให้แน่นเพื่อทำเป็นถุง everted intestine นำถุงลำไส้บ่ม (incubate) ในสารละลาย Dulbecco's PBS (D-PBS) pH 7.2 ปริมาตร 8 ml อุณหภูมิ 37°C และเติม 95% O_2 และ5% CO_2 ลงใน D-PBS medium เป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปใช้ทดสอบ การเตรียม everted intestine เป็นการเตรียมจากหนูทีละตัว เพื่อให้ลำไส้หนูยังคงสภาพการใช้งาน

การศึกษาผลของรางจืดสกัดน้ำต่อการทำงานของ P-gp ใน everted intestine

นำ everted intestine ที่เตรียมจากลำไส้ส่วน ileum ของหนูแรทที่ได้รับสาร TBA (0.5, 1.0, 2.0 g/kg bw) มาบรรจุสาร rhodamine 123 (200 μM) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ P-gp ปริมาตร 1 ml ลงใน serosal side ผูกปิดปลายด้านบนถุงให้สนิท ส่วน everted intestine ที่เตรียมจากลำไส้ส่วน ileum ของหนูกลุ่มควบคุม นำมาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ negative และ positive control ทำการเติมสารตั้งต้นของ P-gp ตามที่กล่าวในข้างต้น นำลงบ่มในสารละลาย D-PBS, pH 7.2 (8 ml) อุณหภูมิ 37°C และเติม 95% O_2 และ5% CO_2 ลงใน D-PBS medium ตลอดเวลาการทดสอบ โดยกลุ่ม positive control เติมสาร verapamil (100 μg/ml) ซึ่งเป็น P-gp inhibitor ลงในสารละลาย D-PBS เก็บตัวอย่าง D-PBS medium ปริมาตร 200 ไมโครลิตรที่เวลาเริ่มต้น (time 0) ก่อนเติม D-PBS medium ปริมาตร 200ไมโครลิตรทดแทนลงในบีกเกอร์ และทำการเก็บตัวอย่างทุก 10 นาทีจนครบเวลา 60 นาที นำไปตรวจวัดปริมาณ rhodamine 123 ที่ถูกขับออกมาในส่วนของ mucosal medium ด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่น 511 (excitation) และ 534 nm (emission) โดยปริมาณการแพร่ผ่านของ P-gp คำนวณตามวิธีของ Daodee *et al*., (2007)[28]

การศึกษาผลของรางจืดสกัดน้ำต่อการขับออกของสารกำจัดแมลงมาลาไธออนใน everted intestine

นำ everted intestine ที่เตรียมจากลำไส้ส่วน ileum ของหนูแรทที่ได้รับสาร TBA (0.5, 1.0, 2.0 g/kg bw) และจากหนูกลุ่มควบคุมที่แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ negative และ positive control มาทำการบรรจุสารกำจัดแมลงมาลาไธออนความเข้มข้น 0.0027 g/kg bw ปริมาตร 1 ml ผูกปิดปลายด้านบนถุงให้สนิท แล้วทำการบ่มในอ่างน้ำควบอุณหภูมิ 37°C เติม 95% O_2 และ 5% CO_2 ลงใน D-PBS medium ตลอดเวลาการทดลอง โดยในกลุ่ม positive control เติมสาร verapamil (100 μg/ml) ลงในสารละลาย D-PBS เก็บตัวอย่าง D-PBS medium ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่เวลาเริ่มต้น (time 0) ก่อนเติม D-PBS medium ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทดแทนลงในบีกเกอร์ และทำการเก็บตัวอย่างทุก 10 นาทีจนครบเวลา 60 นาที ตัวอย่าง D-PBS medium ที่เก็บได้นำมาสกัดด้วย ethyl acetate ปริมาตร1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm 4 ºC เป็นเวลา 5

นาที ครบเวลาเก็บส่วน supernatant ลงในหลอด eppendorf นำไปประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วนำมาละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 200 ml มาลาไธออนวิเคราะห์ด้วย HPLC (Algilent 1100 series, Japan) ตามวิธีของ Islam *et al*. (2009)[29]

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้สถิติ One-Way ANOVA เพื่อทดสอบความแตกต่างของกลุ่มข้อมูล กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ *P*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05

ผลการวิจัย

จากการสังเกตไม่พบความผิดปกติใดๆ ในหนูแรทที่ได้รับรางจืดสกัดน้ำ (TBA, 0.5-2.0 g/kg bw) ในระยะเวลา 28 วัน สัตว์ทดลองกินอาหารและน้ำได้ตามปกติ น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่ม($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น (initial weight) และไม่พบความผิดปกติของอวัยวะใดๆ จากการสังเกตด้วยตาเปล่า น้ำหนักตับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 1.18 เท่าในกลุ่ม TBA (1.0 g/kg bw) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control แต่อย่างไรก็ตามเมื่อได้รับ TBA เพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.0 g/kg bw พบว่าน้ำหนักตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ TBA 0.5 และ 1.0 g/kg bw ตามลำดับ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักไตในทุกกลุ่มที่ได้รับ TBA เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร vehicle (ตารางที่ 1)

ผลของรางจืดสกัดน้ำ (TBA) ต่อการทำงานของเอ็นไซม์ cytochrome P450s (CYPs) ในตับหนูแรท

การติดตามการทำงานด้วยปฏิกิริยา alkoxyresorufin *O*-dealkylation (AROD) พบว่ารางจืดสกัดน้ำ (TBA) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP1A1 และ CYP2B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ CYP1A2 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับสาร TBA โดยการทำงานของ CYP1A1 และ CYP2B ในตับหนูแรทลดลงเหลือ 12.74, 9.67 และ 6.83 เท่า และ 8.72, 4.64 และ 3.80 เท่า ตามลำดับในกลุ่มที่ได้รับ TBA 0.5-2.0 g/kg BW ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร vehicle นอกจากนี้การทำงานของ CYP3A4 ที่ตรวจวัดด้วยปฏิกิริยา testosterone hydroxylation พบว่าการทำงานลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อความเข้มข้นของ TBA เพิ่มสูงขึ้น โดยการทำงานของ CYP3A4 ลดลงเหลือ16.56, 16.52 และ 11.32 เท่า ในกลุ่มที่ได้รับ TBA 0.5-2.0 g/kg BW ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร vehicle (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 น้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะของหนูแรทที่ได้รับสารรางจืดสกัดน้ำ (TBA)

Treatment	Body weight (g)		Organ weight (g/100 g bw)	
	Initial weight	Final weight	Liver	Kidneys
Negative control	286.76±20.53	362.67±19.08*	3.83±0.41	0.93±0.12
TBA (0.5 g/kg)	320.08±8.83	394.67±11.67*	4.39±0.26	0.90±0.06
TBA (1.0 g/kg)	322.50±11.26	386.05±30.47*	4.54±0.45[a]	0.92±0.05
TAB (2.0 g/kg)	330.94±11.71	392.00±25.10*	3.69±0.36[b,c]	0.93±0.08

แสดงค่าเป็น mean±SD, ที่จำนวน n=7

* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับ Initial weight

[a,b,c] แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control และ TBA (0.5 g/kg bw) และ TBA (1.0 g/kg bw) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลของรางจืดสกัดน้ำ (TBA) ต่อการทำงานของเอ็นไซม์ Cytochrome P450s (CYPs) ในตับหนู

Group	CYP activities (nmol/min/mg protein)			
	CYP1A1	CYP1A2	CYP2B	CYP3A4
Negative control	0.9827±0.0899	0.1107±0.0552	0.4784±0.1280	0.4365±0.2841
TBA (0.5g/kg bw)	0.1252±0.0471[a]	0.1199±0.0205	0.0417±0.0215[a]	0.0723±0.0055[a]
TBA (1.0 g/kg bw)	0.0950±0.0365[a]	0.1268±0.0295	0.0222±0.0071[a]	0.0721±0.0027[a]
TBA (2.0 g/kg bw)	0.0671±0.0229[a]	0.1163±0.0155	0.0182±0.0057[a]	0.0494±0.0079[a]

แสดงค่าเป็น mean±SD, ที่จำนวน n=7

[a] แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control

ผลของรางจืดสกัดน้ำ (TBA) ต่อการทำงานของ P-gp ใน everted intestine

การทำงานของ P-gp ใน everted intestine ติดตามด้วยการวัดการแพร่ผ่านของ rhodamine 123 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นจำเพาะ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (negative และ positive control) พบว่ารางจืดสกัดน้ำ (TBA) มีฤทธิ์เพิ่มการทำงานของ P-gp โดยอัตราการแพร่ผ่าน (permeability rate) ของ rhodamine 123 ในกลุ่มที่ได้รับ TBA 0.5, 1.0 และ 2.0 g/kg bw มีค่าเป็น 1.9, 1.4 และ 1.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (negative control) ในเวลา 60 นาทีของการทดสอบตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ TBA พบว่าการทำงานของ P-gp ลดลงเมื่อได้รับสาร TBA เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ TBA 0.5 g/kg bw พบว่า การทำงานของ P-gp ลดลงเป็น 0.74 และ 0.65 เท่า ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด TBA 1.0 g/kg bw และ 2.0 g/kg bw ตามลำดับ โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 2.0 g/kg bw ในเวลา 60 นาทีของการทดสอบ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัด TBA สามารถเพิ่มการทำงานของ P-gp ใน everted intestine ได้ แต่ในความเข้มข้นต่ำจะสามารถชักนำการทำงานได้ดีกว่าการได้รับที่ความเข้มข้นสูง (ตารางที่ 3)

ผลของรางจืดสกัดน้ำ (TBA) ต่อการขับออกของสารกำจัดแมลงมาลาไธออนใน everted intestine

ในส่วนของการติดตามการขับออกของมาลาไธออนจาก everted intestine ด้วยวิธี HPLC ในกลุ่มที่ได้รับสาร TBA พบมีการขับออกของสารกำจัดแมลงมาลาไธออนออกจาก everted intestine ในอัตราต่ำกว่ากลุ่ม negative control ที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอัตราการขับออกของมาลาไธออนในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด TBA 0.5, 1.0 และ 2.0 g/kg bw มีค่าการขับออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 0.78, 0.24 และ 0.54 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในเวลา 60 นาทีของการทดสอบ แต่เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร TBA พบการขับออกของมาลาไธออนมีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของ TBA สูงขึ้น (0.5-1.0 g/kg bw) แต่อย่างไรก็ตามการขับออกของมาลาไธออนไม่เป็นไปในลักษณะ dose dependent โดยเมื่อความเข้มข้นของ TBA เพิ่มขึ้นเป็น 2.0 g/kg bw พบการขับออกของมาลาไธออนกลับมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ TBA ความเข้มข้น 1.0 g/kg bw (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลของสารรางจืดสกัดน้ำ (TBA) ต่อการทำงานของ P-glycoprotein (P-gp) ใน everted intestine

เวลา (นาที)	Permeability rate (μg/cm^2)				
	Negative control	Verapamil (100 μg)	TBA (g/kg bw)		
			0.5	1.0	2.0
0	2.06±0.16	1.98±0.18	1.88±0.11	1.89±0.14	2.12±0.007
10	2.20±0.11	2.02±0.16	2.01±0.18	1.95±0.14	2.20±0.18
20	2.60±0.24	2.07±0.18	3.14±0.72	2.67±0.42	3.10±1.02
30	3.76±0.34	2.26±0.27	5.29±1.14[b]	4.31±1.03	4.28±1.95
40	5.83±1.17	2.64±0.45	8.88±2.56[b]	5.89±1.82	5.71±2.72
50	6.79±0.47	3.05±0.66	13.79±3.83[a,b]	9.48±1.97[b]	8.27±3.11
60	8.44±1.18	3.42±0.88	15.73±1.73[a,b]	11.67±2.75[b]	10.38±3.28[b,c]

แสดงค่าเป็น mean±SD, ที่จำนวน n=4

[a,b,c] แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control, verapamil และ TBA(0.5 g/kg bw) ที่เวลาเดียวกัน ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลของสารรางจืดสกัดน้ำ (TBA) ต่อการแพร่ผ่านของยาฆ่าแมลงมาลาไธออนใน everted intestine

เวลา (นาที)	Permeability rate (μg/cm^2)			
	Negative control	TBA (0.5g/kg bw)	TBA (1.0 g/kg bw)	TBA (2.0 g/kg bw)
0	4.82±3.15	1.15±0.56[a]	1.10±0.69[a]	1.27±0.86[a]
10	7.58±7.55	0.89±0.45[a]	0.72±0.37[a]	1.02±0.34[a]
20	7.66±8.51	1.45±0.40	0.93±0.87[a]	1.33±0.88[a]
30	7.43±5.80	2.46±1.88[a]	0.65±00.39[a]	2.18±0.97[a]
40	7.93±4.73	2.56±2.58[a]	1.05±0.70[a]	1.47±0.69[a]
50	7.23±5.08	3.26±2.07	0.71±0.31[a]	2.30±0.87[a]
60	4.81±2.72	3.77±2.37	1.17±0.71[a]	2.58±1.09

แสดงค่าเป็น mean±SD (N=9)

[a] แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ที่เวลาเดียว

อภิปรายผลการทดลอง

รางจืดเป็นสมุนไพรไทย ตามตำรายาไทยได้กล่าวถึงสรรพคุณโดดเด่นในการรักษาอาการพิษ แก้พิษเบื่อเมาที่เกิดจากพืช หรือสัตว์ รักษาอาการถูกพิษต่างๆ รวมทั้งการใช้เพื่อรักษาอาการผู้ที่ได้รับพิษจากสารเคมีร้ายแรง และต้านพิษจากสารกำจัดแมลง รางจืดได้รับการส่งเสริมให้เป็นสมุนไพรที่ใช้บริโภค และโภชนบำบัดทดแทนการใช้ยาสังเคราะห์ต่างๆทั้งในรูปแบบของยาแคปซูล และชาผงชงดื่มเพื่อการล้างพิษ ถอนพิษ แก้เบื่อเมา [14-18, 30] โดยเฉพาะพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต ที่มีกลไกในการเกิดพิษด้วยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และความเป็นพิษในร่างกายจะสูงขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการเมทาโบลิสมผ่านการทำงานของ hepatic cytochrome P450 (CYPs) จากการศึกษาของ Buratti *et al.* (2005)[31] ในส่วนของ human liver microsome พบว่า CYP1A2 และ CYP2B6 เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาโบลิสมของมาลาไธออนที่ได้รับในปริมาณต่ำ ในขณะที่การได้รับในปริมาณสูง การทำงานของ CYP3A4 จะเปลี่ยนมาลาไธออนไปเป็น มาลาออกซอน ซึ่งเป็น toxic metabolite ที่ความเป็นพิษสูงขึ้น ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE และอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาโบลิสมของยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิดอื่นๆ ด้วย ผลการยับยั้งก่อให้เกิดอาการพิษต่อระบบประสาท[10] จากการวิจัยผลของรางจืดสกัดน้ำ (aqueous extract of *Thunbergia laurifolia* Lindl; TBA) ต่อการทำงานของ CYPs ในหนูแรทที่ได้รับรางจืดเป็นเวลา 28 วัน (subchronic) ในครั้งนี้ พบว่า TBA มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP1A1, CYP2B และ CYP3A4 ซึ่งเป็น CYPs isoform ที่สำคัญในกระบวนการเมทาโบลิสมของมาลาไธออน แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของ CYP1A2 ซึ่งการยับยั้งการทำงานของ CYPs ดังกล่าว น่าจะส่งผลต่อการยับยั้งกระบวนการ bioactivation ของมาลาไธออนไปเป็นมาลาออกซอน และอาจจะเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษของมาลาไธออนของรางจืด ในขณะที่การวิจัยของ Rojanasaroj et al. (2014)[32] ที่ศึกษาใน *in vitro* ใน HepG2 cell โดยรายงานถึงการชักนำการแสดงออกของ CYP1A2, CYP2B6 และ CYP3A4 mRNA ของรางจืดสกัดเอทานอล และการชักนำดังกล่าว อาจส่งผลต่อการทำงานที่เพิ่มขึ้นของ CYPs เอนไซม์ได้ ซึ่งฤทธิ์ที่แตกต่างอาจเกิดจากรูปแบบของสารสกัดที่ได้รับ รวมทั้งกระบวนการเภสัชจลนศาสตร์ใน *in vivo* อาจมีผลต่อกระบวนการเมทาโบลิสมของรางจืดในร่างกาย และเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของรางจืดที่บริโภคได้ นอกจากนี้ยังเป็นที่ทราบกันดีว่า P-gp มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการผ่านเข้า-ออกของของยา สารแปลกปลอม และสารพิษชนิดต่างๆ ที่เข้าสู่เซลล์ และเกี่ยวข้องกับกลไกการลดความเป็นพิษของสารที่จะเกิดแก่ร่างกาย ในขณะที่การยับยั้งการทำงานของ P-gp ก็พบว่าทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงของการเกิดพิษจากสารพิษเพิ่มสูงขึ้นได้เช่นกัน [4,33] ผลของรางจืดต่อการทำงานของ P-gp ในการศึกษานี้พบว่า TBA (0.5-2.0 g/kg bw) สามารถชักนำการทำงานของ P-gp ใน everted intestine ให้สูงขึ้นได้ 1.2-1.9 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และความเข้มข้นต่ำจะชักนำการ

ทำงานของ P-gp ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นสูง จากการศึกษา natural flavonoid หลายชนิดจัดเป็น potent inducer ที่สามารถชักนำการทำงานของ P-gp และทำให้เกิดการขับออกของสาร carcinogen ได้ โดยกลไกในการชักนำคือการจับโดยตรงกับ ATP-binding site, steroid-binding site หรือsubstrate-binding site หรือในการศึกษของสาร hyperforin และ kava ที่การชักนำการทำงานของ P-gp ผ่านการกระตุ้น pregnane X receptor และ orphan nuclear receptor ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน MDR1 ที่ควบคุมการแสดงออกของ p-gp[11] ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ TBA ที่มีสารสำคัญในกลุ่ม flavonoid [15] สามารถชักนำการทำงานของ P-gp ได้ แต่ให้ผลในทางตรงกันข้ามในการขับออก (efflux) ของมาลาไธออน โดยผลการศึกษาในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ พบมีการขับออกของมาลาไธออนผ่าน everted intestine ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามาลาไธออนน่าจะเป็นสารตั้งต้นของ P-gp และกลไกการขับออกอาจเกิดจากการกระตุ้นการทำงานของ ATPase เช่นเดียวกับเมทิลพาราไธออน[34] แต่หนูในกลุ่มที่ได้รับ TBA พบการยับยั้งการขับออกของมาลาไธออนในแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TBA แต่ไม่เป็นไปในลักษณะ dose-dependent โดยกลไกการยับยั้งการขับออกของมาลาไธออนอาจเกิดจากการแย่งจับแบบแข่งขัน(competitive) ของ TBA กับมาลาไธออน ในตำแหน่งของ substrate binding site ของ P-gp เช่นใน verapamil ที่มีกลไกยับยั้งการขับออกของสาร rhodamine-123 หรือเมทิลพาราไธออน ในความเข้มข้นสูงที่ยับยั้งการขับออกของ tetramethylrosamine ใน proteoliposomes ด้วยการแย่งจับที่ substrate binding site ของ P-gp ทำให้สารสับสเตรทไม่สามารถเข้าจับกับ P-gp ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการขับออกของสารสับสเตรทชนิดอื่นให้ลดลงได้ [34-36] ดังนั้นกลไกการลดพิษ ของสารกำจัดแมลงมาลาไธออนของรางจืด อาจไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการขับออกของสารผ่าน P-gp แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาถึงผลของรางจืดต่อการทำงานของ CYPs รวมทั้งผลต่อ P-gp และการขับออกของสารแบบ *ex vivo* การศึกษาแบบ *in vivo* ด้วยการติดตามผลการได้รับรางจืดร่วมกับสารกำจัดแมลงมาลาไธออนในสัตว์ทดลอง ยังจำเป็นต้องได้รับการศึกษาต่อไป เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดของรางจืด

การวิจัยในครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่ารางจืดสกัดน้ำ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450s ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เช่นมาลาไธออนไปเป็น effective metabolite ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE รวมทั้งมีฤทธิ์ชักนำการทำงานของ P-gp ซึ่งเป็นโปรตีน ที่สำคัญในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งฤทธิ์ชักนำดังกล่าวอาจเป็นกลไกหนึ่งในการช่วยขับออกของสารพิษชนิดอื่นๆ ที่ร่างกายได้รับ และลดความเป็นพิษของสารพิษต่างๆ ลงได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ในแง่ของสมุนไพรเพื่อการขับพิษควรใช้อย่างระมัดระวัง เนื่องจากหน้าที่สำคัญของ CYPs ในร่างกาย เช่น CYP2B และ CYP3A4 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมทาโบลิสมของยามากกว่า 50% ที่ใช้ในปัจจุบัน รวมทั้งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของ P-gp เนื่องจากการใช้

สารตั้งต้นร่วมกัน หรือ CYP1A1 และ CYP1A2 ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมทาโบลิสมของยากลุ่ม planar aromatic และสารก่อมะเร็ง[37] การยับยั้งการทำงานของ CYPs ย่อมส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมทาโบลิสมของสารต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายได้ และในการแนะนำให้กินรางจืดเพื่อป้องและเพิ่มการกำจัดออก หรือการล้างพิษของสารพิษที่เข้าสู่ร่างกาย จากการเผยแพร่ข้อแนะนำในการบริโภคชาชนิดซองขนาด 2-3 กรัมสามารถชงดื่มกับน้ำร้อนปริมาณ 200 ml ได้วันละ 3 ครั้ง หรือในรูปแบบแคบซูลขนาด 0.5- 1.0 g สามารถกินได้วันละ 3 ครั้ง และสามารถกินหรือดื่มติดต่อกันได้ทุกวัน แต่ไม่ควรบริโภคในปริมาณที่สูงเกินไปนั้น[38] หากพิจารณาจากรูปแบบของรางจืดสกัดที่พบว่ามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน ความสามารถในการลดระดับความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงที่ตกค้างในร่างกาย ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYPs และการชักนำการทำงานของ P-gp ของรางจืดแล้ว การใช้ระยะสั้นทันทีหลังการได้รับสารพิษน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรพิจารณาเพื่อยังประโยชน์ต่อการใช้งาน รวมทั้งการลดปัญหาจากผลข้างเคียงที่อาจส่งผลต่อสุขภาพในระยะยาวแก่ผู้บริโภคได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศ.ดร.พวงรัตน์ ยงวณิชย์ และทุนสนับสนุนโครงการพัฒนานักวิจัยใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2557 และโครงการพัฒนานักวิจัยใหม่ (ร่วมให้ทุน) มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ.2557 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Ortiz de Montellano PR. The cytochrome P450 oxidative system. In: Woolf TF, editor. Handbook of Drug Metaboism. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc; 1999. p.85-108.
2. Okita RT, Masters BSS. Biotransformations: the cyrochromes P450. In Devlin TM, editor. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**.** New York: Wiley-Lis, Inc; 1992.
3. Schinkel AH, Smit JJ, Van Telling O, *et al.* Disruption of the mouse MDR1A P-glycoprotein gene leads to a deficiency in blood-brain barrier and to the increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
4. Pivcevic B, Zaja R. Pesticides and their binary combinations as P-glycoprotein inhibitors in NIH 3T3/MDR1 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 22: 268-76.
5. Lanning CL, Fine RL, Corcoran JJ, *et al*. Tobacco budworm P-glycoprotein: biochemical characterization and its involvement in pesticide resistance. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1291: 155-62.
6. Srinivas R, Shamsundar GS, Jayalakshmi SK, *et al*. Effect of insecticides and inhibitors on P-glycoprotein ATPase (M-type) activity of resistant pest *Helicoverpa armigera*. *Curr Sci* 2005; 88: 1449-52.

7. ปณิตา คุ้มผล. โรคพิษจากสารกำจัดศัตรูพืช ปี พ.ศ. 2552. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2554; 42: 257-71.

8. Buratti FM, D'Aniello O, Volpe MT, et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 295-302.

9. วินัย วนานุกูล, บรรณาธิการ. ภาวะเป็นพิษจากสารออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาร์บาเมต. กรุงเทพฯ: บียอนด์ เอ็นเทอร์ไพรซ์; 2552.

10. De Bleecker JL. Organophosphate and carbamate poisoning. In: Engel AG, editor. *Handb Clin Neurol* 2008; 91: 401-32.

11. Zhou S, Lim LY, Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 2004; 36: 57-104.

12. Sun J, He ZG, Cheng G, *et al.* Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit* 2004; 10: 5-14.

13. Anchalee C, Laurel C V. *Thunbergia laurifolia* Lindl: A detoxification herb. *J Thai Tradit Altern Med* 2010; 8: 211-20.

14. พร้อมจิต ศรลัมพ์. รางจืดสมุนไพรแก้พิษและล้างพิษ [อินเทอร์เน็ท] 2555 [เข้าถึงเมื่อ 20 สิงหาคม 2559] เข้าถึงได้จาก: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0046.pdf

15. พาณี เตชะเสน, ชัชวดี ทองทาบ. การทดลองใช้รางจืดแก้พิษยาฆ่าแมลง. เชียงใหม่เวชสาร 2553; 19: 105-14.

16. สกุลรัตน์ อุษณาวรงค์, ธานี เทศศิริ, ปราโมทย์ มหคุณากร, และคณะ. ผลของรางจืดต่อการลดพิษพาราควอท.วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น 2543; 5: 11-17.

17. Oonsivilai R, Cheng C, Bomser J, *et al.* Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts. *J Ethnopharmacol* 2007; 114: 300-06.

18. อัญชลี จูฑะพุทธิ. รางจืด:สมุนไพรล้างพิษ. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2553;8: 211-9.

19. สุรเดช ผกากด. ระยะเวลาในการรับประทานยาชงรางจืดต่อการลดระดับสารเคมีในเลือดของเกตรกรกลุ่มที่มีผลเลือดไม่ปลอดภัย [ออนไลน์].Health and medicine. 2015 [อ้างเมื่อ 20 มกราคม 2560] http://www.slideshare.net/tonotton/ ppt-id-288

20. นันทวัน ใจกล้า, สายใจ จารุจิตร, เสาวภา เลือกวงษ์. ผลการใช้รางจืดร่วมกับการให้ความรู้เกี่ยวกับการป้องกันการได้รับสารเคมีเข้าสู่ร่างกาย ในผู้ที่มีผลการตรวจสารเคมีในเลือดระดับอันตราย. วารสารวิทยาลัยพยาบาลพระปกเกล้า จันทบุรี 2554;22: 50-60.

21. วิรวรรณ วิสิฐพงศ์พันธ์, วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์, ไชยยง รุจจนเวท, และคณะ. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำสกัดใบรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) ในหนูขาว. วารสารสมุนไพร 2546;10; 23-36.

22. Chivapat S, Chavalittumrong P, Attawish A, *et al*. Chronic toxicity of *Thunbergia*

laurifolia Lindl. Extract. *J Thai Tradit Altern Med* 2009;7:17-25.

23. เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ประชาชน; 2544.
24. Waterborg JH. The Lowry method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. The protein protocols handbook. Human press; 2002. p. 7-9.
25. Sakuma T, Ohtake M, Katsurayama Y, *et al*. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and –nonresponsive mice. *Drug Metab Dispos* 1999;27:379-84.
26. Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J, *et al*. Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369: 89-99.
27. Baltes MRH, Dubois JG, Hanocq M. Ethyl acetate extraction procedure and isocratic high-performance liquid chromatographic assay for testosterone metabolites in cell microsomes**.** *J Chromatogr* B: Biomed Sci Appl 1998;706:201-7.
28. Daodee S, Wangboonskul J, Jarukamjorn K, *et al*. Membrane transport of Andrographolide in Artificial Membrane and Rat Small Intestine. *Pak J Biol Sci* 2007;10:2078-85.
29. Islam S, Afrin N, Hossain MS, *et al*. Analysis of some pesticide residues in cauliflower by high performance liquid chromatography. *Am J Environ Sci* 2009; 5 : 325-9.
30. พิชามญชุ์ อัครยศพงศ์ และคณะ. รางจืดแก้พิษ [ออนไลน์] 2 พฤศจิกายน 2550 [อ้างเมื่อ 20 พฤษภาคม 2555] สืบค้นจาก http://www.ttmed.psu.ac.th/read.php?68
31. Buratti FM, D'Aniello O, Volpe M.T. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab Dispos* 2005; 33;295-302.
32. Rojansaroj A, Tencomnao T, Sangkitikomol. *Thunbergia laurifolia* extract minimizes the adverse effects of toxicants by regulating P-glycoprotein activity, CYP450, and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. *Genet Mol Res*. 2014;13:205-19.
33. Srivalli KM, Lakshmi PK. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. *Braz. J. Pharm. Sci* 2012; 48:353-67.
34. Sreeramulu K, Liu R, Sharom FJ. Interaction of insecticides with mammalian P-glycoprotein and their effect on its transport function. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 1750-7.
35. Dantzig AH, Shepard RL, Cao J, *et al.* Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent

cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Res* 1996; 56: 4171-9.

36. Kondatov RV, Komarov PG, Becker Y, *et al*. Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of *P*-glycoprotein. *Proc Matl Acad Sci USA*. 2001;98: 14078-83.
37. Sirisangtragul W, Sripanidkulchai B. Effect of *Kaemferia galangal* L. and ethyl-*p*-methoxycinnamate (EPMC) on hepatic microsomal cytochrome P450s enzyme activity in mice. *Songklanarin J Sci Technol* 2011; 33: 411-17.
38. ชมนาด. รางจืดกินอย่างไรปลอดภัยชัวร์. ชีวจิต. 2558;18: 12.