

# ผลของสารสกัดสะเดาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กีไอ

## Effect of Siamese Neem Extract on *Plasmodium berghei* Growth

อุบลวรรณ ใจหาญ<sup>1\*</sup>, วรวรร วัชรระสัมพันธ์กุล<sup>2</sup>, สรัญญา ศิริบาล<sup>3</sup> และวรวิฑูมิ สมศักดิ์<sup>4</sup>

Ubongwan Jaihan, Worawan Watcharasamphankul, Saranya Siribal and Voravuth Somsak

<sup>1</sup>นักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น <sup>2</sup>อาจารย์ สาขาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น <sup>3</sup>อาจารย์ สาขานิติเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น <sup>4</sup>อาจารย์ สาขาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น

### Abstract

Leaf aqueous extract of Siamese neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton) was assessed for antimalarial activity *in vivo* using *Plasmodium berghei* infected mice as a model. ICR mice were infected intraperitoneally with  $1 \times 10^6$  *P. berghei* ANKA. Subsequently, the extract was added orally by gavage once a day for 4 consecutive days. Finally, parasitemia was calculated and compared with untreated mice. The result showed that leaf aqueous extract exhibited non-antimalarial activity. The growth of *P. berghei* in the extract treated mice was not significantly different from untreated mice. The results suggested that Siamese neem tree extract might not have antimalarial activity.

**Keywords:** Siamese neem extract, growth, *Plasmodium berghei*

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้สนใจศึกษาสารสกัดจากใบสะเดาในการมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย โดยการใช้หนูทดลองที่ติดเชื้อ พลาสโมเดียมเบอร์กีไอเป็นโมเดลในการศึกษา หนูทดลองสายพันธุ์ ICR ถูกติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กีไอสายพันธุ์ ANKA จำนวน  $1 \times 10^6$  เข้าทางช่องท้อง จากนั้นให้สารสกัดสะเดาทางหลอดอาหารวันละหนึ่งครั้ง เป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน และทำการนับจำนวนเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารสกัดสะเดา จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดสะเดาไม่มีฤทธิ์ในการต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหนูทดลอง เนื่องจากจำนวนเชื้อที่เจริญเติบโตนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารสกัดสะเดา จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดสะเดาน่าจะไม่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

**คำสำคัญ:** สารสกัดสะเดา, การเจริญเติบโต, พลาสโมเดียมเบอร์กีไอ

### บทนำ

สะเดา (Siamese neem tree) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบมากในแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทยด้วย (Sithisam, Supabphol et al. 2005) สะเดานั้นมีสรรพคุณทางด้านการเป็นสมุนไพรมากมาย รวมทั้งมีรายงานมากมายเกี่ยวกับสารสกัดสะเดาว่าสามารถมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและด้านกระบวนการอักเสบ

โดยสารประกอบที่สำคัญของสารสกัดสะเดาคือ Nimbolide ซึ่งพบว่าเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้น (Sithisarn, Supabphol et al. 2006; Chaisawangwong and Gritsanapan 2013) และยังมีรายงานว่าสามารถออกฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในงานเพาะเลี้ยงได้ (Rochanakij, Thebtaranonth et al. 1985; Badam, Deolankar et al. 1987) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงฤทธิ์และสรรพคุณต่างๆของสารสกัดสมุนไพรสายพันธุ์ในประเทศไทยนั้น มีค่อนข้างน้อยมาก โดยเฉพาะฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียในหนูทดลอง

โรคมมาลาเรียยังเป็นปัญหาที่ประชาชนที่อาศัยอยู่ในแถบบริเวณเขตร้อน และร้อนชื้นของโลก รวมทั้งการมีอุบัติการณ์ของการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้มีการศึกษาหาสายต้านมาลาเรียตัวใหม่อยู่เสมอ โดยเฉพาะสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีในธรรมชาติ (Garcia-Bustos and Gamo 2013) ซึ่งมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรต่างๆที่มีในธรรมชาติ ที่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ทั้งในงานเพาะเลี้ยงและในหนูทดลอง เช่น สารสกัดจากชาเขียว และสารสกัดจากขมิ้นชัน (Reddy, Vatsala et al. 2005; Sannella, Messori et al. 2007) เป็นต้น จึงเกิดความสนใจที่จะศึกษาสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ต้านมาลาเรียที่มีอยู่ในประเทศไทยได้ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบสะเดาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium berghei* ในหนูทดลอง

## วิธีการทดลอง

### เชื้อมาลาเรียและหนูทดลองที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเชื้อพลาสมาเดียมเบอร์เกอไอสายพันธุ์ ANKA (*Plasmodium berghei* ANKA, PbANKA) ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่สามารถติดเชื้อได้ในสัตว์กักตบ (Rodent malaria parasite) และเป็นสายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการดื้อยาด้านมาลาเรีย (Sensitive strain) โดยจะทำการฉีดเชื้อ PbANKA จำนวน  $1 \times 10^6$  เข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal, IP) ของหนูทดลองเพศเมียสายพันธุ์ ICR ที่มีอายุระหว่าง 6-8 สัปดาห์ จากนั้นจะทำการตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ด้วยการทำสเมียร์เลือดจากหางหนูทดลองบนแผ่นสไลด์แก้วที่สะอาดแล้วย้อมด้วยสีย้อม Giemsa จากนั้นดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า โดยทำการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดแล้วทำการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (% Parasitemia) เมื่อหนูทดลองมีปริมาณเชื้อ 15-20% Parasitemia จะทำ Sub-passage ด้วยการเก็บเลือดจากหางหนูทดลองเพื่อฉีดเชื้อให้หนูทดลองตัวใหม่ต่อไป

### การเตรียมสารสกัดสะเดา (Sithisarn, Supabphol et al. 2005)

นำใบสะเดาสดมาทำการอบให้แห้งที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียดและนำไปสกัดด้วยน้ำที่ต้มเดือดในอัตราส่วน 1:20 เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการกรองเอาส่วนของน้ำสกัดออกมาจากกากด้วยกระดาษกรองอย่างหยาบ นำส่วนของน้ำสกัดที่ได้มาใส่ในหลอดทดลองและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนใสด้านบนที่เรียกว่าสารสกัดสะเดา (Siamese neem extract, SNE) ที่อุณหภูมิ  $2-8^{\circ}\text{C}$  ในการตรวจวิเคราะห์ระดับของสารประกอบโพลีฟีนอลรวม (Total polyphenolic content) ในสารสกัดสะเดานั้น จะใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer et al. 1999) โดยสารสกัดสะเดาที่มีระดับของสารประกอบโพลีฟีนอลรวม 500-700 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อต่อไป

### ยาด้านมาลาเรียมาตรฐาน

ยาด้านมาลาเรียมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ คือไพริเมธามีน (pyrimethamine) โดยทำการละลายยาใน DMSO ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### ฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาในหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรีย

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาต่อการเจริญเติบโตของ PbANKA ในหนูทดลอง จะใช้วิธีการทดสอบมาตรฐาน 4-day suppressive test (Peters, Portus et al. 1975) โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็นกลุ่มๆละ 5 ตัว ทำการติดเชื้อมาลาเรีย PbANKA ในหนูทดลองทุกกลุ่มจำนวน  $1 \times 10^6$  ทาง IP จากนั้นให้สารสกัดสะเดา 15 กรัมต่อกิโลกรัมทางหลอดอาหารเป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน โดยใช้ยาด้านมาลาเรียมาตรฐานไพริเมธามีนให้หนูทดลองกลุ่มควบคุมบวก และให้น้ำเปล่ากับหนูทดลองกลุ่มควบคุมลบ เมื่อครบเวลาทำการตรวจวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA โดยการย้อมสี Giemsa บนสเมียร์เลือดจากหางหนูทดลองและดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

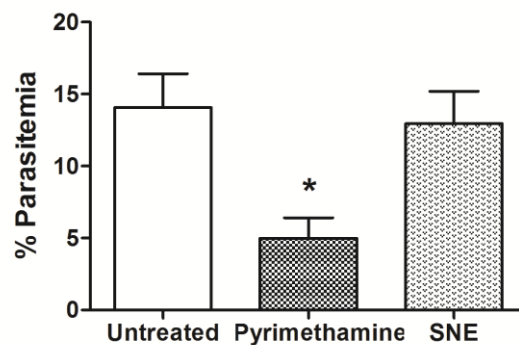
### สถิติ

การทำกราฟแท่งและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism Software การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างนั้นจะใช้ one way ANOVA และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะพิจารณาที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,  $p < 0.05$

## ผลการทดลอง

### ผลของสารสกัดสะเดาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA

หนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรีย PbANKA และได้รับสารสกัดสะเดาทางหลอดอาหารเป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน พบว่าสารสกัดสะเดาไม่สามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA ในหนูทดลองได้ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรียและไม่ได้รับสารสกัดสะเดา โดยพบว่ามี % Parasitemia ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ยาด้านมาลาเรียไพริเมธามีนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA ได้ 90% (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ผลของสารสกัดสะเดาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA หนูทดลองจะติดเชื้อมาลาเรีย PbANKA จำนวน  $1 \times 10^6$  ทางช่องท้องและได้รับสารสกัดสะเดาทางหลอดอาหารเป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน \*  $p < 0.05$

### การอภิปรายผล

สารสกัดจากใบสะเดา สามารถออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชันได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสกัดสะเดาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กีโอ ซึ่งพบว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียแต่อย่างใด (Obih and Makinde 1985; Farahna, Bedri et al. 2010) อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ของสะเดาในเอเชียและในประเทศไทยนั้นค่อนข้างมีความแตกต่างจากสะเดาที่มีในต่างประเทศและอาจจะมีฤทธิ์ที่แตกต่างกันไปได้ (Sithisarn, Supabphol et al. 2006) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะใช้สารสกัดใบสะเดาที่มีในประเทศไทย มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA ในหนูทดลอง จากผลการศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในสารสกัดสะเดานั้นมีปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม และมีรายงานความสัมพันธ์เชิงบวกของระดับโพลีฟีนอลรวมและการต้านอนุมูลอิสระ (Sithisarn, Supabphol et al. 2005; Sithisarn, Supabphol et al. 2006) ดังนั้นสารสกัดสะเดาที่ทำการสกัดได้จึงน่าที่จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารสกัดสะเดาสายพันธุ์ในประเทศไทย แม้จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงแต่กลับไม่มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียในหนูทดลอง ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การสกัดด้วยน้ำซึ่งอาจเป็นตัวแทนละลายที่ไม่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียออกมา หรืออาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารสกัดสะเดาที่หนูทดลองได้รับนั้น มีความเข้มข้นที่น้อยเกินไปจนไม่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียได้ และประการสุดท้ายอาจเนื่องมาจากสารสกัดสะเดาสายพันธุ์ในประเทศไทยนั้น ไม่มีฤทธิ์ในการต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย เหมือนกับผลของสารสกัดสะเดาที่มีการศึกษาในต่างประเทศ

ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงควรที่จะทำการเพิ่มปริมาณและความเข้มข้นของสารสกัดสะเดา ที่จะนำมาให้หนูทดลองที่มีการติดเชื้อ PbANKA รวมทั้งการเปรียบเทียบวิธีการให้สารสกัดสะเดาจากการให้ทางหลอดอาหาร ซึ่งอาจจะมีการดูดซึมจากระบบทางเดินอาหารที่ต่ำ มาเป็นการให้ทางารฉีดเข้าทางช่องท้องและทางเส้นเลือด ซึ่งอาจจะให้ผลการศึกษาน่าเป็นไปได้มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามการศึกษารุ่นนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบสะเดาสายพันธุ์ในประเทศไทยนั้น ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย

### กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักวิจัยและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น, ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมโปรตีน-ลิแกนด์และชีววิทยาโมเลกุล ไบโอบเทค สวทช.

### เอกสารอ้างอิง

- Badam, L., R. P. Deolankar, et al. (1987). "In vitro antimalarial activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf and seed extracts." *Indian J Malariol* 24(2): 111-117.
- Chaisawangwong, W. and W. Gritsanapan (2013). "Quality assessment and scavenging activity of Siamese neem flower extract." *Nat Prod Res* 27(4-5): 394-401.
- Farahna, M., S. Bedri, et al. (2010). "Anti-plasmodial effects of *Azadirachta indica* in experimental cerebral malaria: Apoptosis of cerebellar Purkinje cells of mice as a marker." *N Am J Med Sci* 2(11): 518-525.

- Garcia-Bustos, J. F. and F. J. Gamo (2013). "Antimalarial drug resistance and early drug discovery." *Curr Pharm Des* 19(2): 270-281.
- Obih, P. O. and J. M. Makinde (1985). "Effect of *Azadirachta indica* on *Plasmodium berghei berghei* in mice." *Afr J Med Med Sci* 14(1-2): 51-54.
- Peters, W., J. H. Portus, et al. (1975). "The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity." *Ann Trop Med Parasitol* 67(2): 155-171.
- Reddy, R. C., P. G. Vatsala, et al. (2005). "Curcumin for malaria therapy." *Biochem Biophys Res Commun* 326(2): 472-474.
- Rochanakij, S., Y. Thebtaranonth, et al. (1985). "Nimbolide, a constituent of *Azadirachta indica*, inhibits *Plasmodium falciparum* in culture." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 16(1): 66-72.
- Sannella, A. R., L. Messori, et al. (2007). "Antimalarial properties of green tea." *Biochem Biophys Res Commun* 353(1): 177-181.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, et al. (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent." *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Sithisarn, P., R. Supabphol, et al. (2005). "Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209)." *J Ethnopharmacol* 99(1): 109-112.
- Sithisarn, P., R. Supabphol, et al. (2006). "Comparison of free radical scavenging activity of Siamese neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton) leaf extracts prepared by different methods of extraction." *Med Princ Pract* 15(3): 219-222.