รายงานโครงการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาความสามารถของสะตอในการป้องกันการเกิดพิษต่อยีนของหลอดอาหาร เนื่องจากสารเอ็น-เมทธิลอะนิลีน และไนไตรท์

A study of possible genotoxic protection of sataw (*Parkia speciosa*) in oesophagus treated with N-methylaniline and nitrite

โดย

อโนชา ตั้งโพธิธรรม
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
และ
อลัน เอฟ ฮีเตอร์,
หน่วยระบาดวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Order Key 19089
BIB Key 157234

เลขหมู่ QC2[illegible].952 [illegible]
เลขทะเบียน [illegible]
30 มิ.ย. 2542

ภายใต้การสนับสนุนของ
งบประมาณแผ่นดินปี 2539 และ 2540
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

เพื่อบรรลุเป้าหมายของโครงการ การศึกษานี้ประกอบด้วยงาน 2 ขั้นตอนหลักคือ 1) การจัดตั้งวิธีวัดการสังเคราะห์ DNAที่ไม่เป็นไปตามกำหนด(UDS) ที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจน ในหลอดอาหารของหนูภายหลังการทดสอบ และ 2) การทดสอบความสามารถของสะตอต่อการป้องกันการเกิดพิษต่อยีน

การจัดตั้งวิธีตรวจวัด UDS ด้วยการทดลองแบบในกาย และการทดลองแบบในกาย-นอกกาย เป็นแบบทดสอบที่ได้ใช้ในการทำ การตรวจวัด UDS แบบในกายทดลองโดยให้สารเอ็น-เมทธิลอะนิลีน (MA) และไนไตรท์ (N)ในปริมาณและระยะเวลาให้ต่างๆ ในถุงหลอดอาหารร่วมกับ tritiated thymidine (^{3}H-Thd) เพื่อติดตามการเกิด UDS ตัวบ่งชี้การทำลายของยีนด้วย autoradiography ของเนื้อเยื่อเป็นแบบแรกที่ใช้ แต่ผลการทดลองพบว่าการเกิด UDS มีรูปแบบที่ไม่สม่ำเสมอ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวการทดลอง แบบในกาย-นอกกายจึงได้รับเลือกมาทดแทน การทดลองนี้เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสาร MA และ N เสริมจากอาหารและน้ำปกติ แบบบังคับให้กินเพื่อก่อพิษต่อยีนในหลอดอาหารระยะเวลาหนึ่ง สัตว์ทดลองจะถูกฆ่า และนำเนื้อเยื่อบุผิวของหลอดอาหารส่วน mucosa ไปเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 37°ซ 2 ชั่วโมง กับ ^{3}H-Thd ที่มี/ไม่มีไฮดรอกซียูเรีย (เพื่อระงับการสังเคราะห์ DNAจากการแบ่งเซลล์) สกัดและวัดปริมาณDNA แล้วติดตามปริมาณสารรังสีในUDS ด้วยวิธี Scintillation counting การตรวจวัด UDS ด้วยวิธีแบบในกาย-นอกกายให้ผลเป็นที่น่าพอใจเมื่อ ให้ MA และN เท่ากับ 2.0 และ 3.6 มิลลิกรัมต่อสัตว์ทดลองที่ระยะเวลาให้ 2 ชั่วโมงก่อนการเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมีค่า UDS ในหน่วย dpm ^{3}H-Thd /μg DNA ของกลุ่มปกติและกลุ่มทดสอบ เท่ากับ 2.18 $\pm$ 1.31 และ 3.74 $\pm$ 0.94 ตามลำดับ และค่าทั้งสองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.017)

ก่อนการทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกิดพิษต่อยีนของสะตอ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหาปริมาณเหมาะสมสูงสุดของสารสกัดสะตอในน้ำเมื่อให้เสริมจากอาหารปกติทุกวันนาน 1 สัปดาห์ ที่จะไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติใดๆแก่สัตว์ทดลอง และได้พบว่าสารสกัดสะตอในน้ำอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักให้แบบบังคับให้กินครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร 2 ครั้งต่อวัน เป็นปริมาณที่เหมาะสม เพราะอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลองไม่แตกต่างไปจากกลุ่มปกติ การทดสอบด้วยการให้สารสกัดสะตอนี้แล้วให้สาร MAและN ที่เลือกปริมาณแล้วจะพิสูจน์ความสามารถของสะตอในการป้องกันการเกิดพิษต่อยีนได้

ABSTRACT

To reach the aim of project two main stages of study were performed 1) establishment of a satisfactory test system for detecting the change in unscheduled DNA synthesis (UDS) in the rat oesophagus following treatment; and 2) determination of the antigenotoxic effect of sataw.

Test development was attempted using firstly an *in vivo* method and secondly an *in vivo-in vitro* method. For the former approach suitable doses of N-methylaniline(MA) and nitrite(N) were explored by administration of MA and N into pouch created in the oesophagus of the living rat at various doses and for varying durations. ^{3}H-thymidine (^{3}H-Thd) was also administered and the level of subsequent UDS, as an indicator of gene damage, detected by autoradiography of suitably prepared tissue sections. UDS could not be consistently induced under any of the conditions used. The *in vivo-in vitro* approach was selected to overcome this difficulty. MA and N were administered into the oro-pharynx of 5 week-old male rats, and after selected post challenge- intervals the animal sacrificed and the oesophageal mucosa removed and cultured in the presence of ^{3}H-Thd *in vitro* to 2 hours with and without hydroxyurea (which inhibits replicative DNA synthesis). DNA was extracted, and measured for DNA concentration and the radioactivity measured in a scintillation counter. Satisfactory UDS measurements were obtained after minimum effective doses of MA and N equal to 2.0 and 3.6 mg./ animal, respectively and a post challenge -interval of 2 hours. The UDS values in dpm ^{3}H-Thd /μg DNA unit of the control and treated groups were 2.18 ± 1.31 และ 3.74 ± 0.94 which the different of values was significant at $P = 0.017$.

Prior to determining the antigenotoxic effect of sataw, the maximum tolerated dose of sataw administered into the oro-pharynx twice daily over a period of one week was determined. A homogenate preparing from sataw and water at 1:1 ratio by weight in a volume of 0.5 mL per administration twice a day was the highest dose at which the growth rate of animals was not detectably different from that of controls. Combining these selected doses of MA and N, and sataw extract can allow the determination of antigenotoxic effect of sataw.