

ผลของสารสกัดหยาบจากกวาวเครือดำ *Mucuna macrocarpa* Wall. ต่อโครงสร้างและหน้าที่ของ
อวัยวะสืบพันธุ์ของปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn.

นางสาว จิรารัช ศรีจันทร์งาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1575-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF CRUDE EXTRACT FROM THE BLACK KWAO KRUA
MUCUNA MACROCARPA WALL. ON GONADAL STRUCTURE AND FUNCTION
OF THE NILE TILAPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS* LINN.

Miss Jirarach Srijunngam

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biological Sciences

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1575-3


Thesis Title The effect of crude extract from the black Kwao Krua *Mucuna macrocarpa* Wall. on gonadal structure and function of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn.

By Jirarach Srijunngam

Field of Study Biological Sciences with a major in Cell and Molecular Biology

Thesis Advisor Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree


..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE


..... Chairman

(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)


..... Thesis Advisor

(Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.)


..... Member

(Associate Professor Prakong Tangpraputgul, Ph.D.)


..... Member

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)


..... Member

(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, Ph.D.)


..... Member

(Assistant Professor Apichai Daorai, Ph.D.)

จิราวัช ศรีจันทร์งาม : ผลของสารสกัดหยาบจากกวาวเครือดำ *MUCUNA MACROCARPA* WALL. ต่อโครงสร้างและหน้าที่ของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลานิล *OREOCHROMIS NILOTICUS* LINN. อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ, จำนวนหน้า 177 หน้า. ISBN 974-53-1575-3.

พืชหลายชนิดในสกุล *Mucuna* (วงศ์ Fabaceae) มีคุณสมบัติเป็นยาสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคทางระบบสืบพันธุ์ กวาวเครือดำ *Mucuna macrocarpa* ใช้เป็นยาสมุนไพรในตำรายาพื้นบ้านของไทยเพื่อรักษาความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์เพศชายมาเป็นเวลานาน ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัดหยาบจากกวาวเครือดำเพื่อศึกษาผลของพืชชนิดนี้ต่อระบบสืบพันธุ์ของปลานิล *Oreochromis niloticus* จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในลูกปลาอายุ 1 เดือน เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ด้วย Probit analysis ได้ค่า LC_{50} เท่ากับ 65.72 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจากพืชนี้มีความเป็นพิษสูงและเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ

การศึกษาผลกึ่งเรื้อรัง ใช้ปลานิลอายุ 2 เดือน เลี้ยงในสารละลายกวาวเครือดำเข้มข้น 14 ส่วนในล้านส่วนเป็นเวลา 7 เดือน ผลการศึกษาแบบกึ่งเรื้อรังในปลาเพศผู้ไม่พบข้อบ่งชี้การกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของสารนี้ แม้ว่าค่า GSI ของปลาเพศผู้จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม โดยกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมใน 4 และ 5 เดือนหลังให้สาร และกลับเหมือนกันระหว่างสองกลุ่มใน 6 และ 7 เดือนหลังให้สาร แต่ค่า GSI ที่สูงขึ้นน่าจะเกิดจากพยาธิสภาพมากกว่าการเจริญของอวัยวะ ทั้งนี้เนื่องจากในกลุ่มทดลอง ค่า GSI ที่สูงขึ้นไม่มีความสอดคล้องกับการสร้างอสุจิ การศึกษาทางมิถุนวิทยา พบว่าเกิดจุลพยาธิสภาพในเนื้อเยื่ออวัยวะของปลาที่ได้รับสาร โดยมี apoptosis ของเซลล์สืบพันธุ์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่าการสร้างอสุจิจะล่าช้าแต่สารสกัดนี้มิได้ยับยั้งการสร้างอสุจิ การตรวจสอบการทำงานของ 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) โดยวิธีทางมิถุนเคมี พบว่ามีการทำงานน้อยใน 4 เดือนหลังให้สาร และการทำงานเพิ่มขึ้นสูงสุดใน 5 เดือนหลังให้สาร แล้วลดลงสู่ระดับเดียวกับกลุ่มควบคุมในเดือนที่เหลืต่อมา ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า กลไกการสร้างสเต็มรอยด์ของอวัยวะอาจล่าช้าเมื่อปลาได้รับสารสกัดจากพืชนี้

ในปลาเพศเมีย ค่า GSI ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม จากผลการศึกษาพบจุลพยาธิสภาพเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาที่ได้รับสาร มี apoptosis ของโอโอโกเนียในรังไข่ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ จุลพยาธิสภาพหลักที่พบจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนคือความผิดปกติของเซลล์ theca ของไข่ระยะ cortical alveolar และการเกิด hypertrophy ของเซลล์ granulosa ของไข่ระยะ vitellogenic แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากพืชชนิดนี้ไม่ขัดขวางกระบวนการสร้างไข่ การตรวจสอบการทำงานของ 3 β -HSD โดยวิธีทางมิถุนเคมี พบการกุดการทำงานใน 4 เดือนหลังให้สาร และการศึกษาโครงสร้างละเอียด พบว่าเซลล์ theca ของไข่ระยะ previtellogenic ไม่แสดงการสร้างสเต็มรอยด์ แสดงให้เห็นว่าการได้รับสารสกัดจากพืชนี้ มีผลเปลี่ยนแปลงกลไกการสร้างสเต็มรอยด์ของรังไข่ในระยะ previtellogenic

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต *จิราวัช ศรีจันทร์งาม*.....
ปีการศึกษา2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ*.....

4373812723: MAJOR BIOLOGICAL SCIENCES

KEY WORDS: *MUCUNA MACROCARPA*, TILAPIA, REPRODUCTIVE TOXICITY

JIRARACH SRIJUNNGAM: THE EFFECT OF CRUDE EXTRACT FROM THE BLACK KWAO KRUA *MUCUNA MACROCARPA* WALL. ON GONADAL STRUCTURE AND FUNCTION OF THE NILE TILAPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS* LINN. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. KINGKAEW WATTANASIRMKIT, 177 pp. ISBN 974-53-1575-3.

Many species of plants in genus *Mucuna* (Fabaceae) have been recognized as potential natural medicines with significant reproductive effects. *Mucuna macrocarpa* has been used in a traditional Thai remedy for the treatment of male sexual dysfunction. In these studies we used a crude extract to determine the reproductive effect of *M. macrocarpa* on male and female tilapia, *Oreochromis niloticus*. An acute toxicity bioassay performed on 1-month old fry for 96 hours and Probit analysis showed the LC₅₀ at 65.72 ppm, suggesting that the plant extract is highly toxic and harmful to aquatic organisms.

Subchronic effects on gonadal development were examined in stock of *O. niloticus* (2 months old) exposed to 14 ppm of the crude extract for 7 months. The results from subchronic treatment on male tilapia show no indication of an enhanced reproductive effect of this plant extract. There were some significant differences in gonadosomatic index (GSI) between control and treated groups. At 4 and 5 months post-exposure (mpe), GSI of the treated male was significantly higher than that of the control, then became similar at 6 and 7 mpe. However, the increased GSI may be the result of histopathological alterations rather than the enhanced development since the increased GSI was not correlated with the completion of spermatogenesis in the treated fish. Histological study revealed some pathological alterations of testicular tissues in the treated fish, especially the increased germ cell apoptosis. Although the spermatogenesis was comparatively delayed, it was not entirely inhibited. The ultrastructure of germ cells that were capable of complete spermatogenesis was not altered from the treatment with the plant extract. Histochemical detection of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) activity showed low activity at 4 mpe, peak of activity at 5 mpe, and similar levels to the control in later period. It implies that testicular steroidogenesis may be delayed by the treatment of the plant extract.

In female, GSI were not significantly different between groups. The results showed some histopathological alterations of ovarian tissues in the treated fish. Apoptosis of oogonia was observed in the immature ovary. The major histopathological effects were observed at ultrastructural level in the follicular cells, including an ultrastructural alteration in thecal cells of the cortical alveolar oocytes and hypertrophy of granulosa cells of the vitellogenic oocytes. However, the oogenic process was not altered from the treatment. Histochemical detection of 3 β -HSD activity also showed the suppressive effect at 4 mpe. Ultrastructure showed lack of steroidogenic activity in the thecal cells of previtellogenic oocyte. It implies that ovarian steroidogenesis in previtellogenic stage may be altered by the treatment of the plant extract.

Field of study ...Biological Sciences... Student's signature *Jirarach*
Academic year2004..... Advisor's signature *K. Wattanasirmit*

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Kingkaew Wattanasirmit for her valuable suggestions, guidance, patience and encouragement throughout the study.

I wish to express my grateful thank to Professor Dr. Siriwat Wongsiri, chairman of thesis committee for his advice. I also would like to express my appreciation to Associate Professor Dr. Prakong Tangpraprutgul, Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi and Assistant Professor Dr. Apichai Daorai, thesis committee members for their valuable suggestions. I would like to give special thanks to Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart for his generous supply of the plant materials and some chemicals used in this study as well as his useful suggestions as a committee member.

I am grateful to Professor Dr. Ian P. Callard, for his invaluable suggestions, guidance and support during and after Fulbright's program at Department of Biology, Boston University.

I also would like to thank many people who supported in various ways during my Ph.D. study including Associate Professor Dr. Klaewpan Tagerngpol, Mrs. Wannet Korchareanporn, Mrs. Naree Chusrichom and Miss Duenpen Manuch for their help and suggestions in electron microscopy work at Mahidol University, Professor Dr. William Eldred and Dr. Todd Blute for their help and suggestions in electron microscopy work at Boston University, Dr. Duangkhae Sitthicharoenchai for her valuable advice on probit analysis, Associate Professor Dr. Wichase Khonsue for his valuable suggestions and support, and Miss Siriraks Arrathrakorn, Miss Yupin Chutthaisong and Mr. Kobchai Worapimpong for their help with sampling and lab work at Chulalongkorn University

I am indebted to the financial supports from the UDC scholarship and MUA-CU thesis grant from the University Development Committee, the Ministry of University Affairs of Thailand and the Fulbright Junior Research Scholarship Program from Thailand-United States Educational Foundation (TUSEF).

I would like to give my special thanks to Dr. Noppadon Kitana for all his support especially love and understanding throughout my study.

Finally, I would like to dedicate all the best of my thesis to my mother who gives me all the best things in my life.

TABLE OF CONTENTS

	page
Thai Abstract.....	iv
English Abstract.....	v
Acknowledgements.....	vi
Table of Contents.....	vii
List of Tables	x
List of Figures	xi
 CHAPTER I. GENERAL INTRODUCTION	
A. Perspective on traditional medicine and <i>Mucuna</i> species.....	1
B. The black Kwao Krua, <i>Mucuna macrocarpa</i>	3
C. A fish model in reproductive screening assay.....	5
D. Approach used in this study.....	7
Figures	10
 CHAPTER II. ACUTE TOXICITY OF THE CRUDE EXTRACT FROM <i>MUCUNA MACROCARPA</i> ON THE NILE TILAPIA	
Introduction	14
Materials and methods	16
Results	19
Discussion	21
Tables and figures	24
 CHAPTER III. SUBCHRONIC EFFECTS OF THE CRUDE EXTRACT FROM <i>MUCUNA MACROCARPA</i> ON THE TILAPIA TESTIS	

	page
Introduction	31
Materials and methods	33
Results	36
Discussion	42
Figures	47
 CHAPTER IV. SUBCHRONIC EFFECTS OF THE CRUDE EXTRACT FROM <i>MUCUNA MACROCARPA</i> ON THE TILAPIA OVARY	
Introduction	68
Materials and methods	70
Results	73
Discussion	80
Figures	85
 CHAPTER V. EFFECTS OF THE CRUDE EXTRACT FROM <i>MUCUNA MACROCARPA</i> ON GONADAL STEROIDOGENESIS IN TILAPIA	
Introduction	112
Materials and methods	114
Results	118
Discussion	123
Tables and figures	129
CHAPTER VI. GENERAL DISCUSSION AND SUMMARY	157
REFERENCES	161

BIOGRAPHY 177

LIST OF TABLES

	page
Table 2-1 Number of mortality of the tilapia responded to acute exposure of the crude extract from <i>M. macrocarpa</i>	24
Table 2-2 Effective concentrations and 95% confidence limits of <i>M. macrocarpa</i> crude extract from Probit analysis program (SPSS 9.05)	25
Table 5-1 Activity of 3 β -Hydroxy steroid dehydrogenase in <i>O. niloticus</i> testes after exposure to the crude extract from <i>M. macrocarpa</i>	129
Table 5-2 Activity of 3 β -Hydroxy steroid dehydrogenase in <i>O. niloticus</i> ovaries after exposure to the crude extract from <i>M. macrocarpa</i>	130

LIST OF FIGURES

	page
Figure 1-1 The black Kwao Krua, <i>Mucuna macrocarpa</i> Wall. (synonym: <i>Mucuna collettii</i> Lace).....	10
Figure 1-2 Chemical constituents found in the crude extract from <i>M. macrocarpa</i>	12
Figure 2-1 Probit transformed responses from Probit analysis program (SPSS 9.05) of the tilapia exposed to <i>M. macrocarpa</i> crude extract after 96 hours.....	26
Figure 2-2 Photomicrograph of liver tissue of <i>O. niloticus</i>	27
Figure 2-3 Photomicrograph of liver tissue of <i>O. niloticus</i>	29
Figure 3-1 Gonadosomatic indices (GSI) of the male tilapia after 4 to 7 months of exposure (mean \pm SE).....	47
Figure 3-2 Basic histological structure of the tilapia <i>O. niloticus</i> testis.....	48
Figure 3-3 Testes of <i>O. niloticus</i> at 4 months post-exposure.....	50
Figure 3-4 Testes of <i>O. niloticus</i> at 4 months post-exposure.....	52
Figure 3-5 Testes of <i>O. niloticus</i> at 5 months post-exposure.....	54
Figure 3-6 Testes of <i>O. niloticus</i> at 6 months post-exposure.....	56
Figure 3-7 Testes of <i>O. niloticus</i> at 7 months post-exposure.....	58
Figure 3-8 Electron micrograph of the control <i>O. niloticus</i> testes.....	60
Figure 3-9 Electron micrograph of the control <i>O. niloticus</i> testes.....	62
Figure 3-10 Electron micrograph of the treated <i>O. niloticus</i> testes.....	64
Figure 3-11 Electron micrograph of the treated <i>O. niloticus</i> testes.....	66

	Page
Figure 4-1 Gonadosomatic indices (GSI) of the female tilapia after 4 to 7 months of exposure (mean \pm SE).....	85
Figure 4-2 Oocytes of <i>O. niloticus</i> at different stages of development.....	86
Figure 4-3 Ovarian follicles of <i>O. niloticus</i> at different stages of development.	88
Figure 4-4 Ovaries of <i>O. niloticus</i> at 4 months post-exposure.....	90
Figure 4-5 Mature ovaries of <i>O. niloticus</i> at 4 months post-exposure.....	92
Figure 4-6 Mature ovaries of <i>O. niloticus</i> at 5 months post-exposure.....	94
Figure 4-7 Mature ovaries of <i>O. niloticus</i> at 6 months post-exposure.....	96
Figure 4-8 Mature ovaries of <i>O. niloticus</i> at 7 months post-exposure.....	98
Figure 4-9 Electron micrograph of ovarian follicles of the control <i>O. niloticus</i>	100
Figure 4-10 Electron micrograph of ovarian follicles of the treated <i>O. niloticus</i> .	102
Figure 4-11 Electron micrograph of granulosa cells of the control <i>O. niloticus</i> ..	104
Figure 4-12 Electron micrograph of granulosa cells of the treated <i>O. niloticus</i> ...	106
Figure 4-13 Electron micrograph of thecal cells of the control <i>O. niloticus</i>	108
Figure 4-14 Electron micrograph of thecal cells of the treated <i>O. niloticus</i>	110
Figure 5-1 Light micrograph of <i>O. niloticus</i> testes shows Leydig cells in the interlobular spaces.....	131
Figure 5-2 Histochemical detection of 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase (3 β -HSD) activity in testes of <i>O. niloticus</i> at 4 month post-exposure.....	133
Figure 5-3 Histochemical detection of 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase (3 β -HSD) activity in testes of <i>O. niloticus</i>	135

Figure 5-4	Electron micrograph of Leydig cells of <i>O. niloticus</i> at 4 months post exposure.....	137
Figure 5-5	Electron micrograph of Leydig cells of the control <i>O. niloticus</i>	139
Figure 5-6	Electron micrograph of Leydig cells of the treated <i>O. niloticus</i>	141
Figure 5-7	Light micrograph of the ovaries of <i>O. niloticus</i> shows ovarian follicles at different stages.....	143
Figure 5-8	Histochemical detection of 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase (3 β -HSD) activity in the ovaries of <i>O. niloticus</i> at 4 month post-exposure.....	145
Figure 5-9	Histochemical detection of 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase (3 β -HSD) activity in ovaries of <i>O. niloticus</i>	147
Figure 5-10	Electron micrograph of granulosa cells of the control <i>O. niloticus</i> ..	149
Figure 5-11	Electron micrograph of granulosa cells of the treated <i>O. niloticus</i> ..	151
Figure 5-12	Electron micrograph of thecal cells of the control <i>O. niloticus</i>	153
Figure 5-13	Electron micrograph of thecal cells of the treated <i>O. niloticus</i>	155