

บทที่ 1



บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น มีฝนตกชุก ดังนั้นจึงมีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรป่าไม้และพืชพันธุ์ธรรมชาติหลากหลายชนิดจึงมีการนำสารสกัดจากพืชมาใช้แทนสารฆ่าแมลงสังเคราะห์ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชเพื่อลดปัญหามลภาวะอันเกิดจากสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่งผลกระทบต่ออันตรายต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ รวมทั้งปัญหาการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง (ถาวร ท้วมเจริญ, 2534) นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากพืชทดแทนการใช้สารเคมียังช่วยลดเงินตราต่างประเทศในการนำเข้า และยังช่วยสร้างงานใหม่ให้แก่คนในประเทศอันเนื่องมาจากอุตสาหกรรมการผลิตสารสกัดธรรมชาติ (อารมย์ แสงวณิชย์, 2534) พืชที่น่าสนใจและสามารถนำมาใช้สกัดสารเพื่อป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูพืชมีหลายชนิด ซึ่งหนึ่งในจำนวนนั้นคือ สะเดา

สะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* A. Juss เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และมีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดแมลง จัดอยู่ในวงศ์ Meliaceae มีสารที่เป็นพิษต่อแมลงต่าง ๆ สะสมอยู่ส่วนของเปลือกต้น ใบ และเมล็ด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบเป็นจำนวนมากในเมล็ด (เพยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2538; จิวรรณ หุตะเจริญ, 2530) ซึ่งสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบพวก triterpenoids และสารที่มีผลต่อแมลงคือ meliantriol ($C_{30}H_{50}O_5$) สารออกฤทธิ์อีกกลุ่มหนึ่งคือ tetranotriterpenoids (limonoids หรือ meliacins) สารเคมีต่าง ๆ ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสารที่สำคัญหลายชนิด สารที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดแมลง ได้แก่ nimbin, 6-deacetylnimbin, nimbolide, 28-deoxonimbolide, salannin, 3-deacetylsalannin, 3-tigloylazadirachtol (azadirachtin B), azadirachtol, 3-tigloyl-22-23-dihydroazadirachtol, 2',3'-dihydrotigloyl-22,23-dihydroazadirachtol และ 3-tigloyl-13,14-deepoxy-17-hydroxyazadirachtol (azadirachtin G) โดย

เฉพาะ azadirachtin ซึ่งมีมากในเมล็ด มีฤทธิ์เฉียบพลันต่อแมลงมากที่สุด ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจมาก จึงมีการศึกษาทั้งทางด้านคุณสมบัติทางเคมี ตลอดจนศึกษาผลกระทบที่มีต่อแมลงและสิ่งมีชีวิตอื่น (Ketkar, 1982; van der Nat และคณะ, 1991)

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสะเดาได้รับความสนใจจากนักวิจัยของประเทศต่าง ๆ ได้แก่ อินเดีย บังคลาเทศ อังกฤษ อเมริกา เคนยา ฟิลิปปินส์ จีน อิสราเอล นิคารากัว ชูदान เยอรมัน และไทย (ฉวีวรรณ นุตตะเจริญ, 2530) จากรายงานการศึกษาพบว่าสะเดาใช้ได้ผลดีในการป้องกันกำจัดแมลงหลายประเภท ทั้งชนิดปากกัดและปากดูด และแมลงในโรงเก็บ รวมทั้งสิ้น 413 สปีชีส์ ใน 15 อันดับ (ขวัญชัย สมบัติศิริ, 2540; Jotwani และ Srivastava, 1981)

ฤทธิ์ที่สำคัญของสะเดา ได้แก่ ฤทธิ์ในการยับยั้งการกินอาหารของแมลง (Dhanapakiam, 1995; Meshram, 1996; Kulkarni, 1996) เป็นสารไล่แมลง (Sharma, 1993; Ignatowicz, 1995) เป็นสารฆ่าแมลง (Ambethgar, 1996; Naumann, 1996; Monzon, 1994) ยับยั้งการสร้างไข่และการวางไข่ (Dhar และคณะ, 1996; Chung, 1996 ;Okorie, 1990) ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย (Nwosu, 1995; Fabry, 1996; Rojanapo, 1985) ยับยั้งการเจริญและพัฒนาของแมลง (Lowery, 1996) กำจัดไล่เดือนฝอย (Stark, 1996) ยับยั้งการเจริญของโปรโตซัวที่ก่อให้เกิดโรค เช่น เชื้อมาลาเรีย (Benoit และคณะ, 1995; Benoit และคณะ, 1996; Agomo และคณะ, 1992; Jones และคณะ, 1994) และยับยั้งการเจริญของหริ่งพาโนโซมา (Azambuja, 1992; Talakal, 1996) นอกจากนี้สารสกัดสะเดายังมีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นดังรายงานของ Jotwani และ Srivastava (1981) พบว่าสารสกัดจากสะเดาเป็นพิษต่อปลา *Gambusia* sp. และ ลูกอีซอด เมื่อใช้ในอัตราความเข้มข้นที่สูงกว่า 0.4% Osuala และ Okwuosa (1993) พบว่าสารสกัดจากเปลือกต้นมีความเป็นพิษต่อ หอย และ ปลาน้ำจืด ซึ่งฤทธิ์ของสารสกัดสะเดามีความสัมพันธ์กับปัจจัยทางเคมีและฟิสิกส์ เช่น อุณหภูมิ ความเย็น ความเป็นกรด-ด่าง และตัวทำละลายอัลกอฮอล์ จากการศึกษาโดย Singh และคณะ (1996) รายงานว่าสารสกัดสะเดาจากส่วนของใบ

เปลือก กาก น้ำมันสะเดา ยาฆ่าแมลงที่ทำจากสะเดา และ azadirachtin มีฤทธิ์ในการฆ่าหอย นอกจากนี้ Ibrahim และคณะ (1992) พบว่าสารสกัดจากใบสะเดามีพิษต่อไก่ โดยไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและมีการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์และความเข้มข้นของ haemoglobin รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดและมีผลทางพยาธิวิทยาต่อเนื้อเยื่อตับไต เมื่อ ค.ศ. 1987 Ali ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของใบสะเดาต่อแพะและหนูตะเภา ผลการศึกษาทางโลหิตวิทยาพบว่าไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติแต่พบว่าการเพิ่มขึ้นของ aspartate transferase, sorbital dehydrogenase, cholesterol, urea, creatinine และ potassium ในพลาสมา ส่วนผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปรากฏว่ามีการคั่งของเลือดและการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อตับ ไต ปอด สมอง ทางเดินอาหารส่วนดูโอเดนิม และท่อเซมินิเฟอรัส Akah (1991) ได้ทำการศึกษาในกระต่ายโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นในตับ พบว่าถ้าใช้สารสกัดสะเดาที่ความเข้มข้นสูง (2328 mg/kg) มีผลทำให้ระดับเอนไซม์ serum glutamic piruvic transaminase (SGPT), serum glutamic oxaloacetic transsaminase (SGOT), alkaline phosphatase (ALP) ในตับสูงขึ้น มีการตายทั่วไปในเซลล์ตับ และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์บุท่อน้ำดี ส่วนการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองก็มีผู้ศึกษาเช่นกันโดยผู้ทำการศึกษาคือ Cohen และคณะ (1996) ได้ทดสอบความเป็นพิษของสาร limonoid 6 ชนิดคือ nimbolide, epoxyazadiradione, salannin, nimbin, deacetylnimbin และ azadirachtin ที่มีต่อเซลล์มะเร็งของระบบประสาทในหนู เซลล์มะเร็งจากเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการเจริญหรือซ่อมแซมของกระดูกในคน และเซลล์ของแมลง ผลการทดสอบพบว่า nimbolide มีความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมากที่สุด LC_{50} โดยเฉลี่ยประมาณ 6 μ M รองลงมาคือ epoxyazadiradione โดยจะไปมีผลต่อพลาสมาเมมเบรนของเซลล์ ทำให้เกิดการยื่นโป่งเป็นถุงของเยื่อหุ้มเซลล์และต่อมามีรูปร่างเปลี่ยนแปลงยาวขึ้นรวมทั้งมีหนามและส่วนที่ยื่นเป็นแผ่นบาง และต่อมาจะเกิดช่องว่างขึ้นภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ซึ่งมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ในเวลาต่อมา ส่วน azadirachtin ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* แต่มีผล

เล็กน้อยต่อเซลล์แมลงหวี่ การศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันสะเดามีผู้ศึกษาไว้มากเช่นกัน ซึ่งมีผลทั้งในด้านความเป็นพิษ และประโยชน์ทางเภสัชและทางการแพทย์ เช่น มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย (Riar, 1990 และคณะ; Bardhan และคณะ, 1991) ยับยั้งการปฏิสนธิและการฝังตัวของตัวอ่อน (Lal และคณะ, 1986; Riar และคณะ, 1988; Sinha, 1984; Upadhyay, 1990; Riar และคณะ, 1991; Juneja, 1993; Kaushic, 1995; Talwar และคณะ, 1995; Gary และคณะ, 1993; Upadhyay และคณะ, 1993; Upadhyay และคณะ, 1994) ซึ่งมีผลที่จะถูกนำมาใช้ในการคุมกำเนิดต่อไป นอกจากนี้มีรายงานว่าน้ำมันซึ่งสกัดได้จากเมล็ดสะเดาก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันต่อปอดและระบบประสาทส่วนกลางของหนูและกระต่าย (Gandhi, 1988) การศึกษาของ Sinniah และคณะ (1989) ใ้หนูกินน้ำมันสะเดาเพื่อดูความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่ตับอันเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรค Reye-like syndrome จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ตับเกิดความผิดปกติอย่างรวดเร็วและรุนแรงโดยเฉพาะที่บริเวณไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และองค์ประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ ในรายงานของ Lai และคณะ (1990) กล่าวถึงความพิษของน้ำมันสะเดาอันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเนื้อเยื่อสมองเสื่อมในเด็ก และจากการศึกษาถึงผลกระทบของน้ำมันสะเดาต่อการปรับตัวของระบบภูมิคุ้มกันในหนูพบว่าเกิดการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซตส์มากขึ้น (Upadhyay และคณะ, 1992) นอกจากนี้ Koga และคณะ (1987) พบว่าน้ำมันสะเดามีผลต่อกลไกทางชีวเคมีซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรียในเซลล์ตับหนูที่แยกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยจะไปมีผลยับยั้งหน้าที่การทำงานของระบบปฏิกิริยาถูกไซของกรหายใจ ซึ่งเกี่ยวกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีความเป็นไปได้ในกลไกที่จะทำให้เกิดโรค Reye-like Syndrome

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษหรือฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสะเดาที่กล่าวมาข้างชี้ให้เห็นว่า สารพิษจากสะเดาน่าจะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ ดังนั้นในการศึกษารั้วนี้จึงมีความสนใจที่จะนำปลานิลมาใช้ในการทดสอบเนื่องจากเป็นปลาเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพคือเป็นแหล่งอาหารโปรตีน

ที่สำคัญ มีคุณค่าสูงในราคาที่ถูก (สุทธิชัย ฤทธิธรรม, 2530) เลี้ยงง่าย โตเร็ว และทนต่อสภาพแวดล้อมได้เกือบทุกลักษณะ (ทัศนีย์ ภูมิพัฒน์, 2524) ถึงแม้จะไม่ใช่ปลาพื้นเมืองของไทย แต่เป็นปลาที่ได้ถูกนำเข้ามาเพาะเลี้ยงและได้รับการศึกษาพัฒนาเป็นเวลานานจนสามารถปรับตัวได้ดี (สุทธิชัย ฤทธิธรรม, 2530) และสิ่งที่สำคัญปลานิลเป็นปลาที่กรมประมงและกรมวิชาการเกษตรสนับสนุนให้มีการเลี้ยงในแหล่งที่ทำการเกษตรแบบผสมผสาน เช่น การเลี้ยงปลาในนาข้าว และร่องสวน เป็นต้น (ดวงค์ วัฒนสิทธิ์, 2535; มงคล ต๊ะอุ้น, 2536; ปรีชา เขียวเจริญ, 2530; ทรงพรรณ ล้ำเลิศเดชา และคณะ, 2530; สุวรรณ อุยานันท์, 2540; เกียรติศักดิ์ เม่งอำพัน, 2530) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ พาลาก สิงหะเสนี และ วินิจ ต้นสกุล (2530) ในการรวบรวมข้อมูลการใช้ปลาน้ำจืดในประเทศไทยเพื่อเป็นสัตว์ทดลองทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีในห้องปฏิบัติการ โดยพบว่ามักใช้ปลาที่รู้จักกันดี หาง่าย และเป็นอาหารสำคัญ เช่น ปลาในปลานิล ปลาตะเพียนขาว และจากการทดสอบความเป็นพิษของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ฆ่าปลาในประเทศไทยจำนวน 221 ชนิด โดยใช้ปลานิลเป็นตัวทดสอบเช่นกัน (Chiayvareesajja และคณะ, 1987) จากการสืบสวนเอกสารยังไม่พบข้อมูลการศึกษารายละเอียดทางพิษวิทยาที่เกี่ยวกับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลภายหลังได้รับสารสกัดสะเดาอินเดีย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีความสนใจในการศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับตับปลานิลภายหลังได้รับสารสกัดสะเดาอินเดียอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน เพราะตับเป็นอวัยวะสำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม และยังเป็นแหล่งของการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษด้วยวิธีการทางชีววิทยาหรือเมตาบอลิซึมของสารพิษ (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว และคณะ, 2535) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการขับสารพิษออกอีกด้วย (Jobling, 1995) ทั้งนี้อาจมีผลทำให้เซลล์ตับเกิดความผิดปกติหรือได้รับความเสียหายได้ในเวลาต่อมา ดังนั้นตับจึงเป็นอวัยวะที่สามารถเป็นตัวบ่งชี้สภาพการปนเปื้อนของสารพิษที่อาจเกิดขึ้นได้กับปลาซึ่งเป็นอาหารของมนุษย์และอาจส่งผลกระทบต่อมายังคนซึ่งเป็นผู้บริโภคอีกต่อหนึ่งในระบบห่วงโซ่อาหาร ได้มีผู้ทำการศึกษาตับปลาหลายชนิด รวมทั้งปลานิลและปลาในกลุ่ม Tilapia ได้มีการทดสอบสารพิษหลายประเภทที่คาดว่ามีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ เช่น สารโลหะหนัก ยาฆ่าแมลง

ยาฆ่าเชื้อรา ยาฆ่าวัชพืช คราบน้ำมัน หรือเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคแก่ปลา เช่น ไวรัส และโปรโตซัว รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษต่อดับปลาจากน้ำในแหล่งมลพิษ เช่น แหล่งชุมชน หรือแหล่งโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น เนื่องจากดับเป็นอวัยวะเป้าหมายสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพจากสารพิษ ดังนั้นข้อมูลการศึกษาผลกระทบจากสารพิษทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังของอวัยวะนี้จึงเป็นที่น่าสนใจและจำเป็นสำหรับการค้นคว้าต่อไปในอนาคต สำหรับการวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารตะเดอินเดียมต่อดับปลานิลที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยมุ่งเน้นไปที่การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อและเซลล์ของดับปลานิลหลังจากที่ปลานิลได้รับสารนี้มิกซีในระดับความเข้มข้นต่ำ 10.41 mg/l เป็นเวลานาน 5 เดือน โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะประโยชน์และสนับสนุนการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาทดแทนสารเคมีทางการเกษตร เพื่อลดผลกระทบอันเนื่องมาจากการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ในขณะที่เดียวกันก็น่าติดตามศึกษาว่าสารสกัดธรรมชาติเหล่านี้จะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นหรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงในแหล่งเกษตรกรรมดังกล่าวอาจจะได้รับผลกระทบจากสารสกัดธรรมชาติทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและอวัยวะโดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่อดับซึ่งเป็นแหล่งที่มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษที่ได้รับเข้าไป ซึ่งอาจมีผลต่อการเสริมฤทธิ์หรือลดพิษได้ในเวลาต่อมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn. หลังได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียหรือนิมิกซ์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานาน 5 เดือนในห้องปฏิบัติการ โดยในแต่ละเดือนจะสุ่มตัวอย่างปลาแล้วนำไปตรวจสอบผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อและเซลล์ตับด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านตามลำดับ

สำหรับการศึกษาในระดับกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจะเน้นดูการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ เช่น การสะสมของไฮยาลิน แกรนูลและไขมัน ลักษณะการถูกทำลายของเนื้อเยื่อ ความผิดปกติของเยื่อหุ้มตับ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไขมันกับไกลโคเจนในเซลล์ตับ การแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว และรวมถึงความผิดปกติของเส้นเลือด ส่วนการศึกษาในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจะดูการเปลี่ยนแปลงของออร์แกเนลต่าง ๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดสะเดาอินเดียหรือนิมิกซ์ เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาความเป็นพิษตกค้างที่จะมีผลต่อปลาน้ำจืดในแหล่งที่ทำการเกษตรแบบผสมผสาน
2. ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับปลานิลหลังได้รับสารสกัดสะเดาในระดับความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน 5 เดือน เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาถึงความเหมาะสมของการใช้สารสกัดจากสะเดาในการป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูพืชแบบชีววิธีในบริเวณแหล่งที่ทำการเกษตรแบบผสมผสาน