

Abstract

Project Code: MRG5280123

Project Title: *In vitro* screening of selected Thai medicinal plants for antiprotozoal activity and cytotoxicity.

Investigator: Assist. Prof. Dr. Oumaporn Tasanor Rungsuriyawiboon

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasart University, Rungsit

E-mail Address: Tasanor@yahoo.com

Project Period: 16 March 2009 to 15 March 2011

Introduction: Protozoans are the cause of widespread morbidity and mortality in many countries of the world, including diseases such as malaria, sleeping sickness, Chagas disease, amoebosis and leishmaniosis. Malaria alone causes more than a million deaths and several hundred million cases of severe disease each year. Unlike in several other diseases there are still no vaccines on the market for any disease caused by protozoans, and very often anti-protozoal agents are rather old drugs associated with severe side-effects and/or problems of resistance.

Objective: This research aims to investigate the *in vitro* anti-protozoal and cytotoxicity and antioxidant activities of lipophilic extracts from different plant families, namely Asteraceae, Meliaceae, Simaroubaceae, Fabaceae, Connaraceae and Rubiaceae.

Materials and methods: Twenty-seven extracts (six families) of Thai plants commonly used by traditional healers to treat malaria and other diseases were collected, and lipophilic extracts were obtained. A fraction of the lipophilic extract was partitioned between water and chloroform (H₂O/ CH₂Cl₂) mixture (1:1) (100ml: 100 ml), shaken vigorously for about 1 hr and allowed to settle for 24 hr in a separating funnel. The antiplasmodial activity of the extracts was tested *in vitro* against chloroquine resistant clone (K1) and a chloroquine sensitive clone (3D7) of *Plasmodium falciparum* and *Crithidia fasciculata* were performed. Cytotoxicity assay were performed against human hepatocarcinoma (HepG2) and human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7), as compared to normal African green monkey kidney epithelial cell lines (Vero) and Mouse embryonic fibroblast - adipose like cell line (3T3L-1). Antioxidant activity of extracts was checked with ABTS^{•+} decolorization assay (ABTS) and Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP).

Results and summary: The results of antimalarial activity showed that *Aglaia odorata* Lour., *Spilanthes acmella* Murr., *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. and *Azadirachta indica* A. Juss had a potent effect

with the selectivity index was higher than 10. Under the conditions of the studies toxicity, all extracts were found to be non-toxic against normal cells (Vero and 3T3L-1). Leaf extracts of *Azadirachta indica* A. Juss showed the highest cytotoxicity to HepG2 with selectivity index was 2.85. Stem bark of *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr showed the most active extract to MCF-7 with selectivity index was 3.54. The results of anti-cryptidial activity showed that all extracts can produce the moderate effect with IC_{50} between 5000-10000 ng/ ml. Total antioxidant activity (TAC) showed the most active was the stem bark of *Spilanthes acmella* (L.) Murray when testing with ABTS method (21.29 μ mol/g) and the stem bark of *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.3 when testing with FRAP method (1144.60 μ mol/g), indicating may provide good sources of antioxidants. Thin layer chromatography indicated the presence of alkaloid and triterpenoids from roots, leaves and stem bark of *Spilanthes acmella* (L.) Murray, *Derris trifoliata* Lour., and *Aglaia odorata* Lour. However, the effective of activities of lipophilic extracts depends on the concentration range used and the types of cells. (*Aglaia odorata* Lour.). The overall results of this study represent some Thai medical plants can provide an insightful knowledge on antimalarial, anticryptidial, cytotoxicity and antioxidant activities and maybe used as natural medicine for malaria treatment and cancer.

Keywords: Lipophilic extract, Antimalarial, Anticryptidial, Cytotoxicity, Antioxidant activities

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5280123

ชื่อโครงการ : การสำรวจและทดสอบหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อโปรโตซัวและฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร. อูมาพร ทาเสนาะ รุ่งสุริยะวิบูลย์ สังกัด คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail Address: Tasanor@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 16 มีนาคม พ.ศ. 2552 ถึง 15 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2554

บทนำ: พยาธิโปรโตซัวเป็นสาเหตุที่สำคัญทำให้เกิดการล้มตายและการเจ็บป่วยในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งก่อโรคมาลาเรีย โรคเหงาหลับ โรค"ซิกาสา" โรคบิดและโรคโลหิตมาเนีย โดยเฉพาะโรคมาลาเรียในแต่ละปีทำให้ผู้คนล้มตายสูงกว่าหนึ่งล้านคนและหนึ่งร้อยล้านคนแสดงอาการติดเชื้อที่รุนแรง โรคติดเชื้อพยาธิโปรโตซัวไม่เหมือนโรคชนิดอื่นๆเนื่องจากยังไม่มีวัคซีนสำหรับที่ใช้รักษาออกจำหน่ายในท้องตลาด และบ่อยครั้งพบว่ายาที่ใช้รักษาการติดเชื้อพยาธิโปรโตซัวชนิดเดิม มักมีพิษข้างเคียงและ/หรือก่อปัญหาการดื้อยา

วัตถุประสงค์: งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม ชื่อ *Crithidia fasciculata* พร้อมตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งและความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของสารสกัดกึ่งหยาบที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 6 สกุลได้แก่ วงศ์ดาวเรือง วงศ์กระเทียม วงศ์คนทา วงศ์ถั่ว วงศ์ถอบแถบและวงศ์เข็ม

วัสดุและวิธีการ: ทำการเก็บพืชสมุนไพรไทยจำนวน 27 ตัวอย่างจากทั้งหมด 6 สกุล ซึ่งส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้รักษาอาการไข้มาลาเรียหรือโรคอื่นๆ สารสกัดกึ่งหยาบเตรียมจากการสกัดด้วยส่วนผสมระหว่างน้ำและคลอโรฟอร์มในสัดส่วนที่เท่ากัน ทำการเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อให้แยกส่วนระหว่างน้ำและคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมที่คือต่อยาคลอโรควิน (K1 clone) และไวต่อยาคลอโรควิน (3D7 clone) รวมทั้งเชื้อ *C.fasciculata* ในหลอดทดลอง พร้อมกับทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดกึ่งหยาบต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 และ MCF-7 เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติชนิด 3T3L-1 และ Vero ทำการวิเคราะห์หาดัชนีชี้วัดความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระได้แก่ วิธี ABTS^{•+} decolorization assay (ABTS) และวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

ผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง: จากการทดลอง พบว่าสารสกัดกึ่งหยาบที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมในหลอดทดลองได้แก่ ประยงค์ (*Aglaia Odorata* Lour.) ผักคราดหัวแหวน (*Spilanthes acmella* Murr.), สี่พันคนทา (*Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.) และสะเดา

อินเดีย (*Azadirachta indica* A. Juss.) โดยแสดงค่าความเป็นพิษอย่างเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อมาลาเรีย (SI > 10) ภายใต้สภาวะที่ศึกษาความเป็นพิษ สารสกัดกึ่งหยาบทั้งหมดที่ใช้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติชนิด Vero และ 3T3L-1 สารสกัดที่แยกได้จากส่วนใบของสะเดาอินเดียมีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้สูงสุดและมีค่าความเป็นพิษอย่างเฉพาะต่อเซลล์มะเร็ง (SI=2.85) ส่วนสารกึ่งหยาบจากเปลือกต้นของสีฟันคนทามีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้สูงสุดและมีค่าความเป็นพิษอย่างเฉพาะต่อเซลล์มะเร็ง (SI=3.54) สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อ *C.fasciculata* สารสกัดกึ่งหยาบจากพืชที่นำมาทดสอบในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 5000-10000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดสมุนไพรที่มีดัชนี TAC สูงที่สุดด้วยวิธี ABTS คือ เปลือกถอบแถบน้ำ (*Derris trifoliata* Lour.) (21.29 $\mu\text{mol/g}$) ส่วนวิธี FRAP assay คือ เปลือกของยางพลา *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.3 (1144.60 $\mu\text{mol/g}$) แสดงให้เห็นว่าพืชทั้งสองชนิดเป็นแหล่งของสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ผลการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) ของสารสกัดชนิดผักกระฉ่อนหัวแหวน (*Spilanthes acmella*), ถอบแถบน้ำ (*Derris trifoliata* Lour.) และประยงค์ (*Aglaia odorata*) พบสารกลุ่ม alkaloids และ terpenoids ยกเว้นสารสกัดจากใบของมะฮอกกานีใบใหญ่ (*Swietenia macrophylla*) ที่พบเฉพาะ alkaloids การสกัดสารบริสุทธิ์จากใบและเปลือกต้นของคนทา (*Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.) พบว่ามีรูปแบบของสารสำคัญคล้ายกัน อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของสารสกัดกึ่งหยาบจากพืชสมุนไพรที่ได้นำมาศึกษานี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่นำมาศึกษาและช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ ผลการศึกษารังนี้โดยภาพรวมให้ความรู้เกี่ยวกับพืชสมุนไพรไทยบางชนิดมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ด้านเชื้อ *C.fasciculata* ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและมีสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารจากธรรมชาติอาจนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อมาลาเรียและโรคมะเร็ง

คำสำคัญ : สารสกัดกึ่งหยาบ ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Crithidia fasciculata* ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ