การประเมินความเป็นพิษที่มีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์และโครงสร้างโครโมโซม และศักยภาพการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์จากสารสกัดลูกใต้ใบโดยทดสอบกับหอมแขก *(Allium cepa)*

Evaluation of Cytotoxicity and Antimutagenic Potential of Aqueous Extract of *Phyllanthus niruri* L. by Using Allium Test

ชญานิศ กลองรัง[1] และ **ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม**[1]

Chayanit Klongrung[1] and Siriluck Iamtham[1]

บทคัดย่อ

การประเมินความเป็นพิษที่มีผลต่อเซลล์และศักยภาพการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์จากสารสกัดลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri* Linn) หรือ PNAE โดยทดสอบกับหอมแขก (*Allium cepa*) ในการทดสอบความเป็นพิษนำรากหอมแช่ในสารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้นต่างกัน (1, 2 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชม. ส่วนการทดสอบการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ นำรากหอมแช่ในโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชม. และอีกชุดการทดลองแช่ในสารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชม. ก่อนที่จะแช่ในโซเดียมเอไซด์ เปรียบเทียบกับ positive control (โซเดียมเอไซด์) และ negative control (น้ำสะอาด) โดยดูความผิดปกติของโครโมโซมและดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index, MI) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่า MI ของ negative control กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 2 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดมีความเป็นพิษในระดับเซลล์เล็กน้อย ทำให้การแบ่งตัวลดลงทุกชุดการทดลอง การเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดลูกใต้ใบพิจารณาจากค่า suppression percentage (SP%) พบว่าค่า SP% เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญซึ่งมีค่าเท่ากับ 65.79, 81.58 และ 92.10 เปอร์เซ็นต์ ในสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 1, 2 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูกใต้ใบเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ ซึ่งโซเดียมเอไซด์ชักนำให้โครโมโซมในรากหอมเกิดความผิดปกติขึ้น และพบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ชักนำให้เกิดความผิดปกติได้หลายแบบได้แก่ โครโมโซมแตกหักเป็นชิ้นส่วน (chromosome fragment) ชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น (polyploidy) ไมโครนิวเคลียส (micronucleus) โครโมโซมแบบสะพาน (chromosome bridge) นิวเคลียส 2 นิวเคลียส (binucleus) และ โครโมโซมเกาะกลุ่มเหนียวแน่น (sticky chromosome)

ABSTRACT

The cytotoxic and antimutagenic potential of *Phyllanthus niruri* aqueous extracts (PNAE) was evaluated using the *Allium cepa* assay. For the cytotoxic test, the onion root tips were exposed to different concentration of PNAE (1, 2 and 3 µg/ml) for 24 hours. For the antimutagenicity test, the onion root tip cell were treated with 300µg/ml of sodium azide (NaN_3) for 3 hours and PNAE were given at 1, 2

[1]สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[1]Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

and 3 µg/ml for 24 hours prior to sodium azide treatment. In comparison with positive controls (sodium azide) and negative control (sterile water), antimutagenic potential of PNAE were evaluated by microscopic analyses. The onion root tips were squashed after colchicines treatments and the cells were analyzed for chromosome aberration and mitotic index (MI). The MI of PNAE at 2 and 3 µg/ml were statistically significant when compared with the MI of negative control, which indicated its mild cytotoxicity by reducing the MI in all treatment groups.The potential of antimutagenesis of PNAE were determined by suppression percentage (SP%). The SP% was statistically significant increase in root tips cell pretreated with PNAE which is 65.79, 81.58 and 92.10% in PNAE at 1, 2 and 3 µg/ml, respectively. These results suggest that the PNAE has antimutagenic potential against sodium azide, which induced chromosome aberration in *Allium cepa* root meristem cell. The chromosome aberration commonly found in this experiment were chromosome fragment, polyploidy, chromosome bridge, binucleus and sticky chromosome.

Key Words: *Phyllanthus niruri* Linn, mutagen, antimutagenicity

e-mail address: faassli@ku.ac.th

คำนำ

ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri* Linn.) (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, 2552) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยมาช้านาน เนื่องจากเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถขึ้นได้เองตามธรรมชาติในทุกภาค หาใช้ได้ง่าย อีกทั้งยังเป็นที่ยอมรับว่ามีสรรพคุณในการรักษาโรคได้หลากหลายขึ้นอยู่กับตำรับยาของแต่ละพื้นที่ โดยการนำส่วนต่างๆ ของพืชมาใช้ทั้งในรูปของพืชสด และแบบแห้ง (โรงพยาบาลอู่ทอง, ม.ป.ป.) จนถึงปัจจุบันวิธีการใช้สมุนไพรเริ่มเปลี่ยนไปโดยการแปรรูปให้มีความสะดวกในการใช้งานมากยิ่งขึ้น และหนึ่งในการแปรรูปนั้นก็คือการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้สารสำคัญที่ต้องการ (พิสิฏฐ์, 2541) อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ใช้ได้ อันเนื่องมาจากตัวสารสกัดของลูกใต้ใบหรือผลของปัจจัยต่างๆ ระหว่างกระบวนการแปรรูป จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาถึงผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้น นั้นจึงเลือกการวิเคราะห์โครโมโซม โดยศึกษาในรากหอมเพื่อดูอัตราการแบ่งเซลล์ และความผิดปกติที่เกิดขึ้นต่อโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากหอมเป็นพืชที่ดีที่สุดในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมเพราะมีโครโมโซมจำนวนไม่มากนักและมีขนาดพอเหมาะ การศึกษาเซลล์ปลายรากหอมจึงเป็นวิธีที่สะดวกทั้งในการศึกษาการเจริญของรากหอม (macroscopic) และการศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic) เซลล์รากหอมมีเอนไซม์หลายชนิดซึ่งผสมผสานหน้าที่ของเอนไซม์ออกซิเดสใช้ในการกระตุ้นให้ pro-mutagen กลายเป็น mutagen โดยที่ระบบนี้จะสามารถใช้ตรวจสอบสารเคมีให้แสดงความเป็นพิษได้ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการทดสอบสารเคมี น้ำเสียของโรงงานได้ อีกทั้งระบบนี้ยังสามารถใช้ทดสอบได้กับสารหลายชนิดเนื่องจากมี pH ที่กว้างคือตั้งแต่ 3-11 โดยไม่มีผลต่อระบบรากของหอม (Geirid, 1993) ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดลูกใต้ใบ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมรากหอม

1. นำหอมแดงลอกเปลือกด้านนอกที่แห้งแล้วออก และตัดรากเดิมออก

2. แช่ในน้ำประปาและเปลี่ยนน้ำทุกวันจนกว่าจะได้รากที่ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร จากนั้นสามารถนำไปทดสอบกับสารละลาย และ โซเดียมเอไซด์ต่อไป

การทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรกับปลายรากหอม

1. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบ

1.1 เตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.2 นำหอมที่เตรียมไว้มาแช่ในสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้หอมลอยเหนือสารแล้วมีเพียงรากที่จมอยู่กับสารสกัด และนำไปแช่กับน้ำประปาอีกหนึ่งชุด เพื่อทำเป็นชุดควบคุมและเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลอง จากนั้นนำไปแช่ต่อในโคลซิซีนอีก 24 ชั่วโมง ตัดรากเพื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2. ทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์

2.1 เตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.2 เตรียมสารละลาย sodium azide ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.3 นำหอมที่เตรียมไว้มาแช่ในสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วนำหอมมาแช่ในสารละลาย sodium azide ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยให้หอมลอยเหนือสารแล้วมีเพียงรากที่จมอยู่กับสารละลายจนครบ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ต่อในโคลซิซีนอีก 24 ชั่วโมง ตัดรากเพื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยชุดควบคุมนั้นจะนำหอมมาแช่ใน โซเดียมเอไซด์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แทนการแช่ในสารสกัดจากนั้นแช่ในโคลซิซีนอีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาแล้วนำรากไปศึกษาดูความผิดปกติ

การย้อม และนับจำนวนเซลล์

1. เก็บตัวอย่างรากที่ทำการทดสอบ โดยการตัดรากออกมาส่วนปลายรากสีขาวขุ่นยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ใส่ในน้ำยาคงสภาพนำมาวางบนสไลด์โดยหนึ่งชุดการทดลอง ทำ 3 สไลด์

2. หยดกรดไฮโดรคลอริก 1-2 หยด ทิ้งไว้ 5นาที

3. หยดด้วยสีย้อมอะซีโตออร์ซีน 1-2 หยด

4. ใช้เข็มเขี่ยขยี้ปลายรากเพื่อให้เซลล์กระจายออกจากกัน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

5. ใช้เทคนิค Squash แล้วจึงนำไปตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟส ที่มีโครโมโซมกระจายดี ซึ่งเป็นระยะที่นิยมใช้นับจำนวนของโครโมโซมแล้วทำการคำนวณค่า mitotic index

การวิเคราะห์ข้อมูลและการแปลผล

นำสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้วไปศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจนับ และบันทึกภาพความผิดปกติต่างๆ ของโครโมโซมเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของโครโมโซมของกลุ่มทดลองและ กลุ่มควบคุม โดยเซลล์ที่จะนับควรมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 16 และไม่เกิน 16 แท่ง จากนั้นทำการตรวจนับเซลล์ไม่น้อยกว่า 1,000 เซลล์ ในแต่ละซ้ำของการทดลอง ยกเว้นกรณีที่ไม่อาจหาเซลล์ที่ทำการแบ่งมากไปกว่านี้ได้

1. กรณีการทดสอบอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดไมโทซิส (Mitosis)

เพื่อศึกษาพิษของสารที่มีต่อเซลล์ (cytotoxicity) จะวัดค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (Mitotic Index: MI) ซึ่งได้จากการสุ่มตรวจดูเซลล์โครโมโซมของปลายรากหอม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์แบ่งใน 1,000 เซลล์ของแต่ละกลุ่มทดลองต่อจำนวนเซลล์เมทาเฟสในจำนวน 1,000 เซลล์ของกลุ่มควบคุม ค่าดัชนีการแบ่งเซลล์คำนวณได้ดังนี้ (วีระเกียรติ และจุฑามาศ, 2547)

$$\text{Mitotic index (\%)} = \{A/B\} \times 100$$

เมื่อ A = จำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบไมโทซีสในเซลล์รากหอม

B = จำนวนเซลล์ที่พบในเซลล์รากหอม 1,000 เซลล์

2. การตรวจสอบการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ (Antimutagenesis)

เพื่อศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ สามารถคิดได้จาก Suppression percentage (SP%) โดยมีสูตรการคำนวณดังต่อไปนี้ (Ragunathan and Panneerselvam, 2007)

$$\text{Suppression percentage (SP\%)} = 100\% - N_1/N_2 \times 100\%$$

เมื่อ N_1 คือ จำนวนความผิดปกติทั้งหมดของโครโมโซมที่ผ่านการแช่ในสารสกัดร่วมกับแช่ในโซเดียมเอไซด์

N_2 คือ จำนวนความผิดปกติทั้งหมดของโครโมโซมที่แช่ในโซเดียมเอไซด์

ศึกษาความผิดปกติที่เกิดขึ้น 300 เซลล์ต่อทรีทเมนต์ แล้วบันทึกภาพตัวแทนความผิดปกติแบบต่างๆ และนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ และค่าความผิดปกติของโครโมโซมระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้หลักสถิติ One-way Anova ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบ

1.1 ดัชนีการแบ่งเซลล์ (Mitotic Index)

จากการทดลองพบว่า positive control มีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากลูกใต้ใบมีผลยับยั้งอัตราการแบ่งเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากลูกใต้ใบเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อัตราการแบ่งเซลล์น้อยลง โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดลูกใต้ใบ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับ 24.83 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นที่ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับ 21.50 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นที่ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับ 16.00 เปอร์เซ็นต์และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (negative control) ซึ่งมีอัตราการแบ่งเซลล์สูงสุด เท่ากับ 34.20 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของศุภี (2553) ได้ทำการการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกใต้ใบและมะระขี้นกต่อโครโมโซมเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบมีผลไปยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีสโดยอัตราการแบ่งเซลล์จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อระดับความเข้มข้นของสารทดสอบสูงขึ้น การลดลงของค่า MI ต่ำกว่า 22 % เมื่อเทียบกับ negative control ทำให้เกิดการตายบางส่วน (sub lethal) กับสิ่งมีชีวิตได้ แต่ถ้าต่ำกว่า 50% เมื่อเทียบกับ negative control ทำให้เกิดการตายได้ (lethal) (Celik and Aslanturk, 2010) แต่ในการศึกษาสารสกัดนี้ให้ค่า MI ของสารสกัดต่างจากค่า MI ของ negative control ไม่ถึง 22 % จึงไม่จัดว่าเป็นพิษในระดับสูงที่ก่อให้เกิดการตาย

ได้ ค่า MI เป็นดัชนีที่ใช้ในการวัดสัดส่วนของเซลล์ในระยะไมโทซีสในวัฏจักรเซลล์ การยับยั้งการแบ่งเซลล์อาจแปลผลได้ว่าเซลล์มีการตาย หรือมีอัตราการแบ่งตัวที่ช้าลง การลดกิจกรรมไมโทซีสอาจเป็นผลจากการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หรือการสกัดกั้นระยะ G2 ในวัฏจักรเซลล์โดยป้องกันเซลล์ไม่ให้เข้าสู่ระยะไมโทซีส ดังนั้นการลดค่า MI เนื่องจากผลของสารสกัดลูกใต้ใบนี้อาจเนื่องมาจากการรบกวนวัฏจักรของเซลล์ หรือการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และลดจำนวนเซลล์แบ่งตัวโดยสารสกัดจากลูกใต้ใบ ซึ่งจากงานวิจัยของ Plewa *et al.* (1993) กล่าวว่า สมุนไพรหลายชนิดเป็นแหล่งผลิตสารต้านการก่อกลายพันธุ์แต่ในขณะเดียวกันก็อาจพบสารที่ก่อให้เกิดพิษในระดับเซลล์ในพืชนั้นๆได้เช่นกัน ดังนั้นการใช้สมุนไพรที่เชื่อว่ามีความเป็นพิษต่ำ โดยใช้ในทางยาหรืออาหารติดต่อกันเป็นเวลานานๆจึงเป็นข้อที่ควรระวัง

1.2 การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์

จากการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบในการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าสารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบมีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์โดยส่งเสริมให้มีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใช้ NaN_3 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม (Positive control) มีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำสุด เท่ากับ 9.37 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของสารสกัดลูกใต้ใบ 1 2 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับ 11.30 19.00 และ 21.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Table 1) และ เมื่อดูค่า suppression percentage (SP%) หรือ ค่าความสามารถในการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลูกใต้ใบมากขึ้นค่า SP ก็มากขึ้นด้วย ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่า SP มากที่สุด คือ 92.10 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sabir and Rocha (2008) ได้ทำการตรวจสอบผลของสารสกัดลูกใต้ใบชนิดน้ำที่มีต่อหนู ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติในเซลล์ตับ สมอง และไตโดยการใช้สาร pro-oxidants (10 IM $FeSO_4$ และ 5 IM sodium nitroprusside) พบว่าสารสกัดลูกใต้ใบนั้นมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระชนิด 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical และ iron chelation assay ได้ดี ทั้งนี้พบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบสามารถต้านทานการทำลายเซลล์ตับของหนู ที่ให้ยาพาราเซทามอลโดยไปเพิ่มการทำงานของ N-acetyl-cysteine ทำให้ตับถูกทำลายลดน้อยลง

2. ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อความผิดปกติของโครโมโซม

พบว่า มีการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมหลายรูปแบบ คือ แบบแตกหักเป็นชิ้นส่วน (chromosome fragment) แบบมีการเพิ่มของโครโมโซม (polyploidy) แบบสะพาน (chromosome bridge) แบบมีสองนิวเคลียส (dinucleus) แบบเกาะกลุ่มเหนียวแน่น (chromosome sticky) และไมโครนิวเคลียส (micronucleus) (Table 1 และ Figure 1) การที่โครโมโซมระยะเมทาเฟสมีการเกาะกลุ่มเหนียวแน่นเนื่องจากสารสกัดมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดีเอ็นเอ หรือโปรตีน หรือทั้งสองอย่าง หรือมีผลต่อการประกอบตัวกับกลุ่มฟอสเฟตในโมเลกุลดีเอ็นเอ หรือมีผลต่อการอัดตัวของดีเอ็นเอ (DNA condensation) หรือมีผลต่อการเชื่อมภายในหรือระหว่างโครมาติด ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโครโมโซม มีผลมาจากการแตกหักของโครโมโซมหรือการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงโครโมโซมที่พบในเซลล์ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการตาย (lethal) การพบโครโมโซมแบบเป็นชิ้นส่วน (chromosome fragment)แสดงให้เห็นถึงโครโมโซมมีการแตกหัก และสิ่งที่จะพบตามมาคือโครโมโซมในรูปสะพานในระยะอะนาเฟส หรือ เทโลเฟส (chromosome bridge) เนื่องจากการชักนำให้โครโมโซมแตกหักจะไปรบกวนการประกอบตัวของไมโครทิวบูลที่จะสร้างเป็นเส้นใยสปินเดิล นอกจากนั้นการพบ

ไมโครนิวเคลียสซึ่งเป็นดัชนีที่ดีในการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ ไมโครนิวเคลียสเกิดจากชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่มีเซนโทรเมียหรือโครโมโซมที่ไม่ได้ถูกดึงไปยังเซลล์ลูกโดยเส้นใยสปินเดิล(lagging chromosome) และอาจเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตายได้เนื่องจากการขาดหายไปของยีน

ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อเซลล์รากหอมทำให้การพบความผิดปกติของโครโมโซมหลายรูปแบบดังกล่าวแล้วโดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Naik and Juvekar (2003) ที่พบว่าสารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบมีผลต่อเซลล์ไวรัสเอชไอวี-1 ทำให้เกิดความเป็นผิดปกติขึ้นในเซลล์ไวรัส รวมทั้งทำให้เกิดความผิดปกติในการจำลองตัวของรหัสพันธุกรรม และ งานทดลองของสุนา (2548) ที่พบว่าสารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบมีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด SKOV3 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR3 โดยสารสกัดลูกใต้ใบยังสามารถกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการตายแบบ apoptosis อย่างชัดเจนโดยพบการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ เช่น เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ และยังพบว่าสารสกัดลูกใต้ใบอาจมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ช่วง G2/M ซึ่งขึ้นกับเวลาและ ความเข้มข้นของสารด้วย

Table 1 Distribution of different types of chromosomal aberrations in 300 cells analyzed and mitotic index observed in *Allium cepa* after treatment with PNAE (1-3 μg/ml)and or not sodium azide

Treatment	Mitotic Index (%) ± SD	M.N.C	D.N.	Chromosome Abberation				Total	SP%
				C.F.	P.P.	C.B.	C.S.		
Negative control	34.20 ± 9.29 [a]	6	-	8	-	-	-	14	-
Positive control	9.37 ± 0.55 [c]	-	1	36	-	-	2	39	
PNAE 1 μg/ml	24.83 ± 1.24 [ab]	5	-	15	3	1	3	27	-
PNAE 2 μg/ml	21.50 ± 4.42 [b]	3	-	12	9	2	2	28	-
PNAE 3 μg/ml	16.00 ± 0.36 [d]	3	-	6	9	-	8	26	-
PNAE 1 μg/ml +NaN_3 300 μg/ml	11.30 ± 2.38 [c]	-	2	10	1	1	1	15	65.79
PNAE 2 μg/ml +$NaN_3$300 μg/ml	19.00 ± 2.55 [d]	1	-	6	-	1	-	8	81.58
PNAE 3 μg/ml +NaN_3 300 μg/ml	21.67 ± 0.5 [b]	4	-	3	-	-	-	7	92.10

PNAE = *Phyllanthus niruri* aqueous extract

C.F.= chromosome fragment, M.N.C = micronucleus, P.P.= polyploidy, D.N.=dinucleus,

C.B.= chromosome bridge, C.S.= sticky chromosomes

Values followed by different letters on the same column are significantly different (P <0.05).

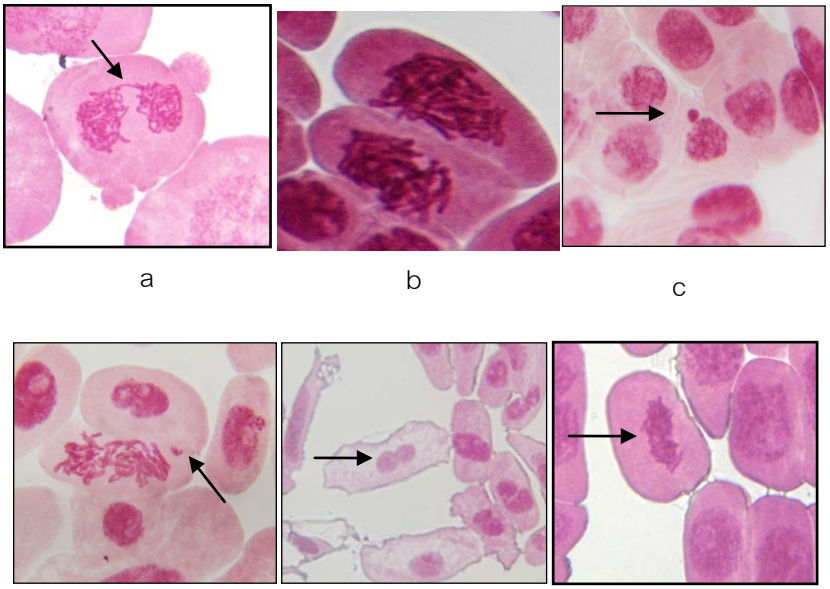

Figure 1 Distribution of different types of chromosomal aberrations on onion root tip cells after treatment with PNAE (1-3 μg/ml) and or not sodium azide

a. chromosome bridge (PNAE1 μg/ml) b. polyploidy (PNAE 2μg/ml) c. micronucleus (PNAE 1 μg/ml) d. chromosome fragment(PNAE 1 μg/ml) e. dinucleus (PNAE 1 μg/ml +NaN_3 300 μg/ml) f. sticky chromosomes (PNAE 3 μg/ml)

สรุป

สารสกัดลูกใต้ใบมีความเป็นพิษในระดับเซลล์เล็กน้อย โดยทำให้การแบ่งเซลล์มีจำนวนลดลงดูได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ (Mitotic index)

สารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบมีความสามารถในการ เป็นสารต้านทานการก่อกลายพันธุ์ ดูได้จากค่า SP โดยที่ความเข้มข้น 3 μg/ml มีค่าการต้านทานสูงสุด คือ 92.10 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมหลายแบบคือ chromosome bridge, polyploidy, micronucleus, chromosome fragment และ chromosome sticky

สารสกัดลูกใต้ใบนี้ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสารสกัดหยาบเนื่องจากการใช้ประกอบเครื่องยาที่ใช้ในปัจจุบันก็ใช้จากสารสกัดหยาบเช่นเดียวกันนี้ ดังนั้นในสารสกัดหยาบอาจมีส่วนผสมของสารประกอบหลายชนิด บางชนิดอาจเป็นพิษในระดับเซลล์หรือระดับยีน สารอื่นอาจให้ผลตรงกันข้ามคืออาจไม่เป็นพิษ ดังนั้นผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าลูกใต้ใบซึ่งมีสรรพคุณทางยามามาย แต่อาจก็ให้ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพขึ้นได้เช่นกันหากใช้ไม่เหมาะสม หรือใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานาน

เอกสารอ้างอิง

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. 2552. **กลุ่มยาแก้ไข้ ลดความร้อน: ลูกใต้ใบ**. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. แหล่งที่มา: http://rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_09_14.htm, 30 ตุลาคม2554.

พิสิฏฐ์ ธีรสุขาภรณ์. 2541. **การพัฒนาวิธีการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสาร Phyllanthin จากต้นลูกใต้ใบ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

โรงพยาบาลอู่ทอง.ม.ป.ป.. **สมุนไพรรักษาโรค**. Pantown online socity for everyone. แหล่งที่มา: http://www.pantown.com/group.php?display=content&id=45901&name=content9&area=3, 22 พฤศจิกายน 2554 .

วีระเกียรติ ทรัพย์มี และ จุฑามาศ ศุภพันธ์. 2547. ความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตในเซลล์รากหอม. **วารสารวิชาการเกษตร** 22(2).

ศุภี คณารักสมบัติ. 2553. **การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกใต้ใบและมะระขี้นก ต่อโครโมโซมเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหารเพาะเลี้ยง**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนา จงสมบูรณ์กุศล. 2548. **ฤทธิ์ในการต้านทานและป้องกันมะเร็งของสารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบ สบู่เลือด และ OVS1 โมโนโคลนอล แอนติบอดี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

Çelik, A. T. and Ö. S. Aslantürk. 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of*Inula viscosa* Leaf Extracts with Allium Test. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 10.11.55/2010/189252

Geirid, F. 1993. Allium test - a potential standard for the assessment of environmental toxicity. **ASTM Special Technical Publication** 1216: 331-345

Naik, A. and A. Juvekar. 2003. Effects of alkaloidal extract of *Phyllanthus niruri* on HIV replication. **Indian Journal of Medical Sciences** 9(57): 387-93.

Plewa, M. J. and E. D. Wagner. 1993. Activation of promutagens by green plants. **Annual Review of Genetics**. 27: 93–113.

Ragunathan, I. and N. Panneerselvam. 2007. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in *Allium cepa*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**. 8(7): 470-475.

Sabir, S.M. and J.B.T. Rocha. 2008. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry** 111: 845–851.

Silva, D. S. B. S., A. C. F. S. Garcia, S. S. Mata, B. de Oliveira, C. S. Estevam, R. Scher and S. M. Pantaleao. 2011. Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.** 21: 92-97.