



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านหอนพยาธิ
และเป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งจากพืชสมุนไพรท้องถิ่นใน 2 วงศ์ คือ

Annonaceae และ Rubiaceae

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โดย
ผศ.ดร. วีระ วงศ์คำ

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

กันยายน 2549

สัญญาเลขที่ MRG4580016

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจสอบสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ
และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากพืชสมุนไพรท้องถิ่นใน 2 วงศ์ คือ
Annonaceae และ Rubiaceae

ผศ.ดร. วีระ วงศ์คำ

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีเซลล์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ดังนั้น สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	1
บทคัดย่อ-ไทย.....	2
บทคัดย่อ-อังกฤษ.....	3
บทนำ.....	4
วิธีการทดลอง.....	9
ผลการทดลอง.....	17
อภิปรายผลและข้อคิดเห็น.....	26
เอกสารอ้างอิง.....	36
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	44
ภาคผนวก 1.....	49
ภาคผนวก 2.....	58
ภาคผนวก 3.....	69

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เพื่อทำงานวิจัย
ชิ้นนี้ให้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ ซึ่งนับว่าเป็นการเริ่มต้นอาชีพนักวิจัยที่แท้จริงในประเทศไทย
หลังจากที่ได้สำเร็จการศึกษาชั้นสูงสุดมาแล้ว ผู้วิจัยขอถือโอกาสนี้กราบขอบพระคุณ
คณะกรรมการผู้พิจารณาทุนและผู้บริหาร สกว. ทุกท่านที่ได้สังเกตเห็นความสำคัญของงานวิจัยชิ้นนี้
ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้พยายามประสานงาน ให้ข้อมูลข่าวสาร และได้ให้โอกาสในการ
เสนอมผลงาน ตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย ในขณะที่เดียวกันต้องขออภัยในความล่าช้าของการ
รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณหน่วยงานทั้งในประเทศและต่างประเทศ ที่ได้ให้การสนับสนุนเชื้อเพื่อ
สถานที่ วัสดุอุปกรณ์สารเคมี ตลอดจนสัตว์ทดลอง ซึ่งหน่วยงานภายในประเทศ ได้แก่ ภาควิชา
วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร
และหอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; ห้องปฏิบัติการ
เทคโนโลยีเซลล์สัตว์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนา
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ หน่วยปฏิบัติการกลางไบโอเทค จังหวัดปทุมธานี หน่วยงาน
ต่างประเทศ ได้แก่ Infectious and Immunity Research Unit, Division of Biomedical Sciences,
King's College London, University of London, UK.; FRAME Alternatives Laboratory,
School of Biomedical Sciences, University of Nottingham, UK. และ Wolfson's Centre for
age-related disease, King's College London, University of London, UK.

ขอขอบใจลูกศิษย์ทุกคนที่ได้คอยเอาใจใส่และช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี
และขอขอบคุณอย่างสูงสำหรับผู้ที่ไม่ประสงค์จะออกนามและได้ช่วยงานวิจัยนี้ในทุกๆ ด้านจน
สำเร็จในที่สุด

ขอกราบระลึกถึงพระคุณครูอาจารย์ทุกระดับ ผู้ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาการให้แก่ผู้วิจัยจน
สามารถทำประโยชน์ให้เกิดขึ้น

วีระ วงศ์คำ

กันยายน 2549

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG4580016

ชื่อโครงการ การตรวจหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านหนอนพยาธิ และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากพืชสมุนไพร
ท้องถิ่นใน 2 วงศ์ คือ Annonaceae และ Rubiaceae

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน ผศ.ดร. วีระ วงศ์คำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

e-mail address weerah@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

การค้นหารายการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านหนอนพยาธิ หรือเซลล์มะเร็งตัวใหม่ เป็นเรื่องจำเป็น
เร่งด่วน เนื่องจากมีแนวโน้มของการดื้อยา ทั้งมีตัวยาที่ออกฤทธิ์อย่างได้ผลในปัจจุบันไม่มากนัก ประกอบกับตัวยา
ต่อต้านหนอนพยาธิส่วนใหญ่หรือยารักษามะเร็งได้ก่อผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย และยังไม่มีการวิจัยด้านนี้อย่างจริงจัง
ในประเทศไทย ทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นเป็นเป้าหมายและวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ ที่จะริเริ่มให้มี
ห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐานขึ้นในคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้เลือกหนอนสองชนิดที่ใช้งานได้ดีใน
ห้องปฏิบัติการคือ หนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* และ *cercaria* ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma*
mansoni ได้เลือกใช้เซลล์มะเร็ง 2 เซลล์สายพันธุ์ของคน คือ MCF-7 (มะเร็งเต้านม) และ HeLa (มะเร็งปากมดลูก)
และเซลล์สายพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติของคนมาใช้อีกหนึ่งชนิดคือ AMC-K46 เป็นเซลล์น้ำคร่ำ
นอกจากนี้ยังใช้เซลล์ปกติ (เซลล์ปฐมภูมิ) ของตัวอ่อนหนูทดลองคือ M44 มาใช้ในการศึกษาความเจาะจงของการ
เลือกออกฤทธิ์นี้ด้วย มีการเก็บพืชจำนวน 15 สปีชีส์ มาจากสองวงศ์คือ Annonaceae และ Rubiaceae และนำมา
สกัดด้วยเอทานอลหรือน้ำ หาค่า IC_{50} ของการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อหนอนและเซลล์สายพันธุ์โดยวิธีการ MTT
assay หรือ SRB assay พบว่ามีสารสกัด 3 ตัวอย่างจากผลอ่อนและใบพืชในวงศ์ Annonaceae ที่ออกฤทธิ์ได้
ดีกว่า praziquantel และยังพบฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งจากสารสกัด 3 ตัวอย่างนี้ด้วย โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่า
ellipticine คาดว่าสารออกฤทธิ์นี้คือ acetogenin ซึ่งมีผู้ศึกษาอย่างกว้างขวาง แต่ยังไม่พบว่ามีรายงานการศึกษา
ในผลอ่อนของพืชกลุ่มนี้ ได้ทำการเลือกสารสกัดที่ออกฤทธิ์ดีในการต่อต้านเซลล์มะเร็งจากพืช 3 สปีชีส์ คือ
Annona reticulata (ผลอ่อน), *Annona squamosa* (ผลอ่อน) และ *Melodorum fruticosum* (ใบ) ในการทดสอบ
ทางด้านพันธุพิษวิทยาในเซลล์ AMC-K46 พบว่าสารสกัดจาก 2 ตัวอย่างแรกมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์
และพบความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดอีกด้วย แต่เซลล์เหล่านี้มีจำนวนมากกว่า
เซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และมีร้อยละจำนวนความผิดปกติดังกล่าวน้อยกว่าเซลล์ที่
ได้รับยารักษา มะเร็งมาตรฐานคือ mitomycin C อย่างเห็นได้ชัด สำหรับสารสกัดของพืช 2 สปีชีส์ในวงศ์
Rubiaceae คือ *Ixora lobbii* (ใบ) และ *Paederia foetida* (ต้น) แสดงฤทธิ์ที่ดีมาก และยังคงแสดงความเจาะจงสูงใน
การเลือกออกฤทธิ์ ต่อ *C. elegans* แต่สารสกัดทั้งหมดจากพืชวงศ์นี้ไม่ได้แสดงฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งเลย

คำหลัก amniocyte, genotoxicity, ellipticine, mitomycin C, praziquantel

Abstract

Project code : MRG4580016

Project Title : Screening for Anthelmintic and Antitumor Compounds from the Indigenous Medicinal Member of the Two Plant Families, Annonaceae and Rubiaceae

Investigator : Assist. Prof. Dr. Weerah Wongkham, Dept. of Biology, Fac. Of Science, Chiang Mai University

E-mail address : weerah@chiangmai.ac.th

Project period : 2 years

Searches for new bioactive anthelmintic or antitumor compounds are urgently needed. There were evidences of anthelmintic compound resistance with few other effective choices. Most of the present anthelmintic or antitumor compound always exhibited side effect to the patient. There was almost no research of screening for the new anthelmintic compound in Thailand. With all the themes mentioned, the purposes and aims of this project were accordingly set for the initiation of the high standard laboratory in the Faculty of Science, Chiang Mai University. Two species of worm have been chosen due to their availability of life cycle in laboratory, the nematode *Caenorhabditis elegans* and the cercaria of blood fluke, *Schistosoma mansoni*. Two human cancer cell lines have been chosen, MCF-7 (breast cancer cells) and HeLa (cervical adenocarcinoma cells). The human amniocytic cell line with spontaneous mutation, AMC-K46, and the normal primary cells from laboratory mouse embryo, M44, was also used for the evaluation of the selective activity of the bioactive compounds. Fifteen species of plant from the two families, Annonaceae and Rubiaceae, were extracted using ethanol or aqueous. The IC_{50} of each extract was determined by the MTT assay or SRB assay on the worms and the cell lines. There were 3 extracts from young fruit and leaves of annonaceous plant expressed the anthelmintic activities against the worms, better than praziquantel. Antitumor activity was also observed and evaluated from the 3 extracts with the result better than that of ellipticine. Annonaceous acetogenins are thought to be the active compounds in this study, with enormously studies and revises. None of which has been referred to any extract from young fruit of the plant. The antitumor-extracts with highest activity from the 3 annonaceous plant were determined and used in genotoxicity assay to AMC-K46; *Annona reticulate* (young fruit), *Annona squamosa* (young fruit), and *Melodorum fruticosum* (leaves). The exposed-cells to the former two extracts were expressed the inhibition to the mitotic cell division with several types of chromosome aberration. These cells exhibited a non significant different in percentage of number to the control unexposed-cells, but clearly less than the cells exposed to mitomycin C. Extracts of the two species from Rubiaceae, *Ixora lobbii* (leaves) and *Paederia foetida* (stem) expressed very good activities with highly selective to inhibit *C. elegans*. All the extracts of the plant from this family showed none of the antitumor activity.

Keywords : amniocyte, genotoxicity, ellipticine, mitomycin C, praziquantel

บทนำ

การควบคุมโรคอันเกิดจากหนอนพยาธิ หรือปรสิตในมนุษย์นั้น เป็นกระบวนการที่ต้องการความสัมพันธ์ของกิจกรรมต่างๆ ในหลายๆ ด้าน จนทำให้ระดับของการระบาดต่ำกว่าระดับของความมีนัยสำคัญของความร้ายแรงของโรค กิจกรรมที่กล่าวนั้นจะต้องมีการทำที่สอดคล้องกัน เช่นการให้การศึกษาด้านสุขอนามัยและสิ่งแวดล้อม การยกระดับมาตรฐานของกิจกรรมสุขภาพและการประปาในชุมชน ตลอดจนอาจจะมีการควบคุมพาหะของโรคให้ได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพ และการให้ยาหรือสารเคมีโดยตรง และในอนาคตอันใกล้นี้ ความก้าวหน้าในการควบคุมหนอนพยาธิอาจก้าวไปถึงขั้นที่มีการใช้วัคซีนจากสารพันธุกรรม (DNA vaccine) เพื่อป้องกันการติดหรือได้รับระยะติดต่อของหนอนพยาธิหลายๆชนิดอีกด้วย การควบคุมแบบสอดคล้องกันนี้ทำได้ผลมากในประเทศที่กำลังพัฒนาหลายๆ ประเทศ เช่นประเทศไทย ทำให้การระบาด และปัญหาที่เกิดจากโรคที่เกี่ยวข้องกับหนอนพยาธิในคนไทยมีน้อยลงทุกที แต่ในประเทศด้อยพัฒนา และกำลังพัฒนาในอีกหลายๆประเทศปัญหากำลังซำรอยเดิมกับประเทศไทยในอดีต (Blas *et al.*, 2006) และถึงแม้ว่าตัวยาที่มีอยู่ในปัจจุบันจะมีประสิทธิภาพสูง และมีความนิยมใช้อย่างแพร่หลาย เป็นต้นว่า benzimidazole carbamates, ivermectin และ praziquantel (Doenhoff *et al.*, 2000; Hrckova *et al.*, 2006; Doenhoff and Pica-Mattocchia, 2006) แต่ก็ยังมีหนอนพยาธิอีกหลายชนิดที่ยังไม่มียาที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยที่สามารถนำมาใช้ในการกำจัดได้ เช่น macrofilaria พยาธิหนอนตัวจืด (*Gnathostoma* sp.) และหนอนพยาธิที่พบในสัตว์ต่างๆ ทั้งสัตว์เลี้ยงและ สัตว์ใช้งาน เป็นต้น (Sing *et al.*, 1996) และนอกจากนี้ยาที่ใช้บางชนิดก็มีราคาแพงเพราะเป็นยาที่ผ่านกระบวนการสังเคราะห์และนำเข้าจากต่างประเทศ อีกประการหนึ่ง มีความชัดเจนมากกว่าหนอนพยาธิในปัจจุบันมีภูมิต้านทานต่อยาที่ใช้มากขึ้น (Ismail *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2001; Doenhoff *et al.*, 2002; Keiser *et al.*, 2006) ซึ่งถึงแม้ว่าจะยังไม่ก่อให้เกิดปัญหามากนักในคน แต่มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่ามีการดื้อยาอย่างเห็นได้ชัดในสัตว์เลี้ยง (Fallon & Doenhoff, 1994) สำหรับในคนการดื้อยาจะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของการควบคุมโรคที่เกิดจากปรสิตที่เป็นเชื้อมาลาเรีย และยังไม่นับรวมเชื้อ HIV ที่ในปัจจุบันนี้ยังไม่พบวิธีการหรือตัวยาที่ใช้ในการบำบัดรักษาอย่างได้ผลชัดเจน ดังนั้นด้วยเหตุปัจจัยดังกล่าวข้างต้นนี้ การตรวจสอบหาสารต่อต้านปรสิตชนิดใหม่ๆจึงเป็นสิ่งจำเป็นและท้าทายเป็นอย่างยิ่ง (Chapuis *et al.*, 1988)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชหรือที่เรียกว่า อัลลีโลเคมีคอล (allelochemicals) เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นและสะสมไว้ในส่วนต่างๆ และมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชซึ่งมนุษย์ได้ให้ความสำคัญของสารเหล่านี้มาช้านานโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้เป็น

ยารักษาโรคต่างๆในรูปของพืชสมุนไพร (Whitfield, 1995) นับเป็นความโชคดีของคนไทยในอดีตจำนวนมากที่ด้วยภูมิปัญญาของการแพทย์แผนไทยที่ได้มีการค้นพบสมุนไพรจำนวนมากที่ออกฤทธิ์ฆ่าหนอนพยาธิที่ใช้กันมาช้านานไว้มากมาย เช่นที่ได้รวบรวมไว้ใน สารานุกรมสมุนไพรและรวมหลักเภสัชกรรมไทย (Wutthi-Dramawetch, 1997) เพียงเล่มเดียว สามารถจำแนกได้ถึง 170 สปีชีส์ ใน 61 วงศ์ ในจำนวนนี้มีเพียงไม่กี่ชนิดที่ได้ถูกนำไปศึกษาทดสอบอย่างเป็นระบบ จนทราบรายละเอียดถึงชนิดและโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ฆ่าพยาธินั้น (anthelmintic molecule) ในปัจจุบันนี้มีความพยายามอย่างมากมาในการพัฒนาทุกชนิดจากพืชสมุนไพรที่ได้รับความนิยมในอดีต และมีบริษัทผู้ผลิตยารายใหญ่มากกว่าหนึ่งร้อยบริษัทที่มีโปรแกรมหรือแผนการในการค้นคว้าวิจัยโดยใช้พืชสมุนไพรจากแหล่งต่างๆทั่วโลก และจากสถิติเมื่อไม่นานมานี้ ของ European Patent Office ในปี 1994 พบว่ามีการจดลิขสิทธิ์มากถึงเกือบ 4,000 สิทธิบัตร ที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งมีแนวโน้มมากขึ้นทุกปีเมื่อเทียบกับสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับสารเคมีสังเคราะห์ที่ลดลงทุกปี เช่นกัน การตรวจสอบหาสารต่อต้านหนอนพยาธิชนิดใหม่ๆนั้น มีแหล่งใหญ่คือจากธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรที่มีประวัติการใช้งานมายาวนาน (Lee and Houghton, 2005) อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเทียบกับการตรวจสอบสารต่อต้านปรสิตที่เป็น โปรโตซัว เช่น มาลาเรียแล้ว การตรวจสอบหาสารต่อต้านหนอนพยาธินั้นมีสัดส่วนที่น้อยมาก (Erdelmeier *et al.*, 2006; Ajaiyeoba *et al.*, 2006) และเมื่อพิจารณาจากจำนวนพืชสมุนไพรที่ใช้หรือมีบันทึกว่าสามารถใช้ต่อต้านหนอนพยาธิทั่วโลกแล้ว ก็ยังมีอีกมากมายหลากหลายชนิด อีกประการหนึ่งเมื่อพิจารณาความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการระหว่างมนุษย์กับหนอนพยาธิ เมื่อเทียบกับโปรโตซัวแล้วมีมากกว่า ดังนั้นการทดสอบแยกแยะหาสารต่อต้านหนอนพยาธิจึงมีความยากลำบากมากกว่า ซึ่งปัญหานี้ถือเป็น intrinsic problem ซึ่งมีสารไม่กี่ชนิดที่ฆ่าหนอนพยาธิแล้ว จะไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงขึ้นกับคนและสัตว์ด้วย (Whitfield, 1995) ดังนั้นในการตรวจสอบหาตัวยาต่อต้านหนอนพยาธิจึงต้องการการทดสอบทางชีวภาพที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยความเหมาะสมในการดำรงไว้หรือเลี้ยงเชื้อพยาธิในในห้องปฏิบัติการ การเลือกใช้กระบวนการในการตรวจสอบที่เชื่อถือได้ และขั้นตอนในการตรวจหาที่เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง (Balbaa and Bassiouny, 2006)

ทางภาคเหนือของประเทศไทยมีการระบาดของหนอนพยาธิของคน และสัตว์เลี้ยงหลายชนิด (ฝ่ายควบคุมโรคติดต่อทั่วไป, 2543) ทั้งที่เป็นพยาธิตัวกลม เช่น พยาธิปากขอ (*Ancylostoma*, *Necator*) พยาธิไส้เดือน (*Ascaris*) พยาธิเส้นด้าย (*Enterobius*) และพยาธิตัวกลมอื่นๆที่ติดต่อถึงคน (*Toxocara*, *Trichinella*) ตลอดจนพยาธิตัวกลมในระบบเลือดและน้ำเหลืองของสุนัข (*Dirofilaria*) และพยาธิตัวกลมในสัตว์อื่น ๆ เป็นต้น ส่วนพยาธิตัวแบนหรือพยาธิใบไม้ก็มีระบาดเช่นกัน เช่น พยาธิใบไม้ตับ (*Ophisthorchis viverrini*) พยาธิตัวติด

(*Taenia*) และที่พบในกระเพาะของวัวควาย เช่น *Paramphistomum* เป็นต้น จะเห็นว่าพยาธิที่กล่าวมาซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มหนอนพยาธิ (helminthes) มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถเลี้ยงและเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการจนครบวงจรชีวิตอย่างปลอดภัย และสามารถนำตัวพยาธิทุกชั้นการเจริญมาใช้ในการทดลองได้โดยสะดวกตลอดเวลาที่ต้องการ และมีต้นทุน และการดูแลที่ไม่สูงมากนัก ดังนั้นหากจะทำการตรวจหาสารต่อต้านหนอนพยาธิจึงจะต้องมีการคัดเลือกและตรวจสอบชนิดของหนอนพยาธิที่จะนำมาใช้เป็นตัวแทนในการตรวจสอบเบื้องต้นอย่างเหมาะสม (Kumar *et al.*, 1995) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หนอนพยาธิที่สามารถพบได้ในท้องถิ่นของจังหวัดเชียงใหม่ อีกประการหนึ่ง ในแต่ละท้องถื่นมักจะมีชนิดของหนอนพยาธิที่ระบาดแตกต่างกันบ้าง ดังนั้นเมื่อไม่สามารถนำพยาธิข้ามถิ่นได้ด้วยเหตุผลทางระบาดวิทยา จึงจำเป็นที่จะต้องมีการคัดเลือกหนอนพยาธิที่มีลักษณะคล้ายกันในการตรวจสอบเบื้องต้น

ขั้นตอนการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในการกำจัดหนอนพยาธิ (anthelmintic compounds) โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน (Whitfield, 1995) คือ (1) การตรวจหาขั้นต้น (primary screening) จากสารสกัดหยาบของพืช (crude extract) และนำไปทำการทดสอบทางชีวภาพ (bioassay) โดยการนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายหนอนพยาธิ หรือตัวหนอนพยาธิโดยตรง (2) การตรวจหาและการทดสอบโดยละเอียด (differential screening) จากสารสกัดที่ได้จากการแยกองค์ประกอบของสารโดยวิธีการทางเคมีวิเคราะห์ เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), หรือ Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) เป็นต้น ซึ่งจะเป็นสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูงและเป็นสารต้นแบบในการนำไปพัฒนาสู่การผลิตเป็นยาได้ และ (3) การทดสอบสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารบริสุทธิ์นั้น (bioactive compounds bioassay) ในการนำไปทดลองกำจัดหนอนพยาธิในสัตว์ทดลอง ตลอดจนการตรวจสอบความเป็นพิษ (toxicity test) ต่อสัตว์ชั้นสูงที่เป็นเจ้าบ้าน (host) ในระดับต่างๆ (intermediate host, definitive host) การสกัดสารจากพืชเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากต้องการสารที่มีความเข้มข้น และความบริสุทธิ์สูง เพื่อให้สามารถประเมินผลการทดสอบในขั้นตอนทั้ง 3 ขั้นได้อย่างรวดเร็วและชัดเจน

สำหรับพืช 2 วงศ์ (families) คือ Annonaceae และ Rubiaceae ที่จะใช้ในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดหนอนพยาธิ นั้นเป็นกลุ่มที่มีพืชสมาชิกที่สามารถหาได้ในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดใกล้เคียง (รวบรวมสรรพคุณจาก วิทย์, 2542 และ Wutthi-Dramawetch, 1997) กล่าวคือ *Annona squamosa* Linn. หรือ น้อยหน่า มีรายงานว่าผลดิบนอกจากจะเป็นยาแก้อาการป่วยต่างๆแล้วยังสามารถใช้เป็น ยาฆ่าพยาธิผิวหนัง กรากเกลื่อน หิด เหา ส่วนเมล็ดนั้น เป็นยาฆ่าพยาธิตัวจิ๋ว ส่วนใบใช้ฆ่าเชื้อโรคภายใน ขับพยาธิลำไส้ และ *Annona reticulata* Linn. หรือน้อยโหนด สามารถใช้ทั้งผลดิบและผลแห้ง มาเป็นยาถ่าย

พยาธิ ส่วนรากใช้รักษาโรคเรื้อน ส่วนเมล็ดใช้สมานแผลและเป็นยาฆ่าแมลง และส่วนเนื้อในเมล็ดนั้นเป็นยาพิษอย่างร้ายแรง อย่างไรก็ตามในพืชทั้งสองชนิดนี้ปรากฏว่าแทบทุกส่วนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางยาได้รวมทั้งเปลือกต้น ที่มีฤทธิ์เป็นยาสมานลำไส้ สมานแผล แก้ท้องร่วง แก้พิษงู แก้รำมะนาด และเป็นยาฝาดสมาน พืชในวงศ์ Annonaceae ในประเทศไทยที่มีสรรพคุณทางยาแต่ไม่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ขับพยาธิมีอีกหลายชนิด ได้แก่ กระดังงา (*Cananga odorata* (Lam.) Hooker & Thoms.) กระดังงาสงขลา (*Canangium fruticosum* E.J.H. Corner) หลายส่วนของพืชมีฤทธิ์ขับปัสสาวะ บำรุงหัวใจ สะแกแสง (*Canangium latifolium* Ridl. หรือ *Unona latifolium* Hook.f.& Th.) ใบมีรสเบื่อเมาสมุนไพรฆ่าพยาธิผิวหนังเรื้อรัง เนื้อไม้ ราก มีรสเบื่อเมา แก้ไข้เชิงงูม แก้พิษทั้งปวง กำจายตัน (*Polyalthia suberosa* Thw.) พบว่าในใบและกิ่งมีสาร suberosol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง ตับเต้าน้อย (*Polyalthia debilis* (Pierre) Finet&Gagnep) ส่วนรากมีฤทธิ์แก้วัณโรค แก้ปวดท้อง ฝีมอบ (*Polyalthia cerasoides* (Roxb.) Benth, ex Bedd.) ใบสดแก้ปวดแก้อักเสบ เนื้อไม้ แก้วัณโรค แก้ปวด และรักษาระบบขับถ่าย เป็นยาคุมกำเนิดในสตรี กำล้างวัณเถลิง (*Anaxagorea luzonensis* Gray.) เนื้อรากมีฤทธิ์เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงกำลัง ตันนมแมว (*Rauwenhoffia siamensis* Scheff.) เนื้อไม้แก้ไข้ต่างๆ ส่วนรากแก้ผอมแห้งหลังคลอด ลำดวน (*Melodorum fruticosum* Lour.) ใช้ดอกเป็นยาแก้ลมวิงเวียน บำรุงหัวใจ ชูกำลัง แก้ไข้ Tuchinda et al. (1991) พบว่ามีสาร melodorinol และ acetylmelodorinol จากการสกัดดอกลำดวน และต่อมา Chaichantipyuth et al. (2001) ได้ใช้อัลกอฮอล์ สกัดจากดอกลำดวนเช่นกัน และพบว่ามีสารประกอบเฮปทีน (heptene) เพิ่มขึ้นมาอีก 3 ชนิดได้แก่ 7-Benzoyloxy-6-oxo-2,4Z-heptadiene-1,4-olide (ชนิดที่ 3); 7-Benzoyloxy-6-oxo-2,4E-heptadiene-1,4-olide (ชนิดที่ 4) และ 7-Benzoyloxy-4-hydroxy-1-methoxy-2E,4Z-heptadiene-1,6-dione (ชนิดที่ 5) และจากการทดสอบกับเซลล์มะเร็งพบว่า สารแทบทุกชนิดมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ที่ใช้ในการทดสอบ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- จัดตั้งและพัฒนาระบบการตรวจหาและทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านหนอนพยาธิขึ้น ในห้องปฏิบัติการ ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ตรวจหาและวิเคราะห์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช บางชนิดในสองวงศ์คือ Annonaceae และ Rubiaceae ที่มีรายงานว่าเป็นสมุนไพรที่ใช้เป็นยาต่อต้านพยาธิในตำรายาโบราณของไทย

- ทดสอบผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชต่อเซลล์สายพันธุ์สัตว์ และคน (animal and human cell lines) ให้ทราบถึงแนวโน้มของความปลอดภัยในการนำสารเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ในอนาคต
- เป็นแนวทางในการนำพืชสมุนไพรที่มีหรือหาได้ในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1 การจัดหาและเลี้ยงหนอนที่ใช้เป็นโมเดล

ได้ทำการเลี้ยงหนอน 2 ชนิดที่เป็นโมเดลแทนหนอนพยาธิ คือ หนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* ซึ่งเลี้ยงในอาหารวุ้น และมีชีวิตที่เป็นอิสระ (ไม่เป็นปรสิต) โดยได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Infections and Immunity Research Group, King's College London, University of London, UK. สามารถนำมาแพร่พันธุ์เพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการได้ และ หนอนตัวแบน *Transversotrema patialense* ซึ่งเป็นปรสิตภายนอกของปลาขนาดเล็กหลายชนิด และมีหอยเจดีย์ *Melanoides* sp. เป็นโฮสต์กึ่งกลาง โดยเก็บตัวอย่างหอยที่ตรวจพบว่ามี การติดเชื้อปรสิตชนิดนี้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ แล้วนำมาเลี้ยงในอ่างเลี้ยงในห้องปฏิบัติการร่วมกับปลาหางนกยูง (*Poecilia* sp.) ซึ่งสามารถทำให้วงชีวิตสมบูรณ์ในอ่างเลี้ยงได้ โดยสามารถตรวจพบ ตัวเต็มวัยจำนวนหนึ่งจากไตเกล็ดปลาและตรวจพบว่ามี การวางไข่ในอ่างเลี้ยง และสามารถแยกเอาตัวอ่อนชั้น cercaria จากหอย และตัวเต็มวัยจากปลา มาใช้ในการทดลอง จากการทดลองแยก cercaria ออกมาเลี้ยงนอกตัวปลาโดยใช้น้ำสะอาดจากธรรมชาติ และอาหารเลี้ยงเซลล์บางชนิด ได้แก่ RPMI1640 DMEM และ HAMF12 พบว่า cercaria ที่ได้มีช่วงอายุสั้น ไม่เกิน 3-4 ชั่วโมง หลังจากออกมาจากหอย และไว (sensitive) ต่อสภาพแวดล้อมมาก และจำนวนที่ได้มีไม่มากพอที่จะนำมาทำ bioassay เพื่อดูผลกระทบจากสารสกัดหยาบของพืชเป้าหมายได้ เช่นเดียวกับตัวเต็มวัย เมื่อแยกออกมาจากปลาแล้วมีอายุไม่เกิน 30 นาที ในอาหารสำเร็จเช่นกัน ดังนั้นปัญหาของการใช้หนอนชนิดนี้คือ จำนวนที่มีไม่มากพอ และความไวต่อความเปลี่ยนแปลงของสภาพของเหลวรอบตัว และจากการทดสอบหนอนปรสิตชนิดนี้ ในระยะเวลาต่อมาพบว่าไม่สามารถนำหนอนทั้งสองระยะมาใช้ในการทดสอบได้ จึงพิจารณายุติการเลือกใช้หนอนชนิดนี้

ได้ทำทดลองนำเอาหนอนพยาธิหัวหนามในลำไส้ของปลาช่อน (*Channa striata*, Block) ที่มีชื่อเรียกว่า *Pallisentis rexus*, Wongkham & Whitfield, 1999 มาใช้ในการทดสอบสารพิษ โดยแยกเอาทั้งตัวเต็มวัยและไข่จากตัวแม่ที่มีไข่แก่จำนวนมาก นำมาทำการทดสอบเบื้องต้นต่อผลของสารสกัดและยาถ่ายพยาธิ พบว่า การเตรียมตัวเต็มวัยมาใช้ในการทดลองนั้นไม่สามารถทำได้เนื่องจากปัญหาสองประการ คือ จำนวนหนอนพยาธิที่พบจากปลาที่ได้รับจากตลาดมีไม่แน่นอน และพบว่าอาจมีหนอนปรสิตสปีชีส์ (species) อื่นที่มีลักษณะใกล้เคียงกันอยู่ปะปนกันได้ ทั้งการเลี้ยงปลาช่อนในห้องปฏิบัติการนั้นไม่สามารถทำให้ได้ด้ด้วยงบประมาณที่มี อีกประการหนึ่งปรสิตนี้มีวงชีวิตที่เป็นอิสระเฉพาะระยะที่เป็นไข่เท่านั้น ตัวอ่อนที่เป็น infective stage เจริญอยู่ในไรน้ำชนิด copepods (เป็น intermediate host) และการแยกตัวอ่อนออกมาเพื่อทำการทดลองแทบจะกระทำไม่ได้เลยและแต่ละตัวใช้เวลาไม่เหมาะกับการทำงานในการคัดกรองสารสกัดพืชที่มีจำนวนมากได้ แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่า ไข่ของปรสิตชนิดนี้มี

ลักษณะพิเศษนั้นคือมีการฟองตัวและขยายขนาดของเปลือกไข่ที่มีหลายชั้นได้ในสภาพของของเหลวชนิดต่าง ๆ จึงได้ทำการศึกษารายละเอียดในลักษณะโครงสร้าง ซึ่งโดยความเป็นจริงแล้วไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์กับงานวิจัยนี้ได้ แต่เนื่องจากว่าเป็นโครงสร้างและปรากฏการณ์ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนจึงได้ทำการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติฉบับหนึ่ง ดังแนบสำเนา reprint ใน ภาคผนวก 1 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาแล้วไม่สามารถใช้หนอนพยาธิชนิดนี้ในการทดสอบคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เนื่องจากมีความจำกัดในเรื่องของการจัดหาจำนวนให้พอเพียงในการทดลอง และข้อจำกัดในการเลี้ยงเพิ่มจำนวนในห้องทดลอง

ได้ทำการทดสอบผลของสารสกัดต่อหนอนพยาธิใบไม้ในเลือด หรือ *Schistosoma mansoni* ชั้น cercaria โดยทำ bioassay เช่นเดียวกับการทำในหนอน *C. elegans* โดยทำการทดลองที่ ห้องปฏิบัติการ Infections and Immunity Research Laboratory, King's College London, University of London, ประเทศอังกฤษ และที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาประยุกต์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร โดยที่หนอนพยาธินี้มีหอยน้ำจืดคือ *Biomphalaria glabrata* เป็นเจ้าบ้านกึ่งกลาง (intermediate host) จึงได้ทำการทดสอบผลของสารสกัดหอยด้วย โดยทดสอบดูอัตราการเต้นของหัวใจหอยที่ได้รับสารสกัดหยาบของพืชบางชนิด ซึ่งได้แสดงผลโดยละเอียดไว้ในรายงานฉบับนี้ด้วยแล้ว (ดูวิธีการข้อ 4.3)

ได้มีการนำเอาตัวอ่อนชั้น cercaria ของ *Schistosoma japonicum* และ *Schistosoma mekongi* มาทดลองใช้ในการคัดกรองเบื้องต้นด้วย แต่ปรากฏว่าเกิดปัญหาสองประการคือจำนวนของ cercaria จากหนอนพยาธิทั้งสองชนิดนั้นในขณะที่ทำการทดลอง มีไม่มากพอสำหรับการนำมาทดสอบและการจะเพิ่มจำนวนนั้นต้องมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ แต่ที่สำคัญที่สุดคือพฤติกรรมของ cercaria ที่ว่ายน้ำอยู่ในน้ำนานหลังจากออกมาจากหอยพาหะแล้วและมักจะแขวนตัวนิ่งลอยอยู่ที่ผิวน้ำ ทำให้ยากแก่การสังเกตเห็นและการตัดสินว่ามีชีวิตอยู่หรือไม่ ซึ่งต่างจาก *S. mansoni* ทำให้หนอนทั้งสองที่ไม่เอื้อต่อการนำมาใช้ในการทดสอบ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ตัดการนำหนอนทั้งสองมาใช้ คงใช้งานเฉพาะ cercaria จาก *S. mansoni* เท่านั้น

2 การเตรียมเซลล์คนและสัตว์ที่ใช้ในการทดสอบ

2.1 เซลล์สายพันธุ์อมตะ และเซลล์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมจนทำให้เป็นเซลล์สายพันธุ์อมตะ (immortal) คือสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ไม่สิ้นสุด ซึ่งจะนำมาใช้เป็นโมเดลในการตรวจสอบเบื้องต้นนี้ได้แก่ เซลล์ลักษณะลอย (cell suspension) 2 ชนิด คือ U937 (human monocytic cell line) และ K562 (human erythroid myeloma cell line) และเซลล์ลักษณะเกาะ

ชั้นเดียว (monolayer) 3 ชนิด คือ GMK (green monkey kidney cell line), MCF-7 (human breast cancer cell line) และ HeLa (human cervical carcinoma cell line) โดยที่เซลล์สายพันธุ์แรกได้รับจาก ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สายพันธุ์ที่สองจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ และสายพันธุ์ที่สามจาก ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จากการทดสอบเซลล์ลอยทั้งสองสายพันธุ์คือ U937 และ K562 พบว่าหลังจากนำมาทดสอบทางด้านเทคนิคโดยใช้วิธี MTT-assay แล้วปรากฏว่ามีความผันแปรของค่าการดูดกลืนแสงสูง เนื่องจากเครื่องปั่นเหวี่ยงไม่สามารถทำให้เซลล์ที่เลี้ยงใน 96 well plate เกาะตัวแน่นได้ เมื่อเปลี่ยนถ่ายของเหลวจึงทำให้สูญเสียเซลล์จำนวนมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงพิจารณาด
ใช้เซลล์ลอยทั้งหมด

สำหรับเซลล์ GMK ที่มีแผนการใช้ทดสอบเดิม ผู้วิจัยพิจารณาว่า เนื่องจากธรรมชาติของเซลล์นี้เป็นเซลล์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมโดยการใช้ไวรัส (transformation) ไม่ใช่เซลล์มะเร็งโดยต้นกำเนิด (www.atcc.com) ประกอบกับความจำกัดด้านงบประมาณ จึงพิจารณาด
ใช้ในการทดลองนี้

2.2 เซลล์สายพันธุ์ปกติ 4 ชนิด คือ AMC-K46 และ ACF-2 (human amniocytic cell line) CH-4501 (chicken embryonic fibroblast cell line) และ DAO-M44 (mouse embryonic fibroblast cell line) หรือในที่นี้เรียกสั้นๆว่า M44 ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่เลี้ยงจากการทำ primary cell culture ในห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีเซลล์สัตว์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และ พัฒนาจนเป็นเซลล์สายพันธุ์ลักษณะยึดเกาะชั้นเดียว และเป็นเซลล์สายพันธุ์สิ้นสุด (finite cell line) นั่นคือ จะหยุดเจริญและตายประมาณหลังจาก generation ที่ 50-80 ไปแล้ว อย่างไรก็ตามได้มีการเก็บเซลล์สายพันธุ์เหล่านี้ที่ generation ต้นๆ (2-5) โดยการแช่แข็งอย่างยิงวดไนโตรเจนเหลว และสามารถนำมาละลายกลับมาเลี้ยงและเพิ่มจำนวนขึ้นใหม่ได้ และเมื่อใช้จนหมดอายุขัยของเซลล์แล้วก็สามารถพัฒนาขึ้นมาได้ใหม่อีก

ในการทดลองนี้ปรากฏว่า เซลล์ CH-4501 ได้หมดอายุลง เนื่องจากเป็นเซลล์สายพันธุ์แบบสิ้นสุด และจากการศึกษาเซลล์สายพันธุ์จากน้ำคร่ำของคน คือ AMC-K46 และ ACF-2 พบว่าเซลล์ทั้งสองสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ที่เกิดการผ่าเหล่าตามธรรมชาติ (Dasa, 2005) จึงสามารถนำมาใช้ในการทดสอบนี้ในฐานะที่มีลักษณะคล้ายกับเป็นเซลล์ปกติได้มากกว่าเซลล์มะเร็งโดยทั่วไป และเนื่องจากว่าระยะเวลาในการทำวิจัยนี้มีจำกัด การวางแผนในระยะท้ายของการวิจัยไม่สามารถใช้เซลล์ปกติของคนมาใช้ได้เพราะ ผู้วิจัยไม่สามารถขอการปฏิบัติเชิงจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมฯได้ทัน จึงคงสามารถใช้เซลล์ M44 ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบบลาสต์ของหนูทดลองซึ่งเป็นเซลล์ปกติเพียงสายพันธุ์เดียวในการวิจัยนี้เท่านั้น

3 การจัดหาและการสกัดสารจากพืชเป้าหมาย

3.1 ชนิดของพืชจากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และใกล้เคียง :-

Annonaceae: *Annona squamosa* (น้อยหน่า)

Annona muricata (ทุเรียนเทศ)

Annona reticulata (น้อยโหน่ง)

Artabotrys siamensis (การเวก)

Cananga odorata (กระดังงาไทย)

Artabotrys odoratissimus (กระดังงาจีน)

Melodorum fruticosum (ลำดวน)

Melodorum siamensis (นมแมว)

Uvaria rufa (นมควาย)

Desmos chinensis (สายหยุด)

Rubiaceae: *Ixora ebarbata* (เข็มขาว)

Ixora lobbii (เข็มแดง)

Paederia linearis (กระพังโหมตัวผู้)

Paederia foetida (กระพังโหมตัวเมีย)

Kopsia fruticosa (พุดชมพู)

3.2 พืชแต่ละชนิดเก็บแยกส่วนตามความเหมาะสม เช่น ใบ ผล ราก เปลือกต้น นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก และอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C จนแห้งสนิท (ประมาณ 7-14 วัน) นำไปบดให้ละเอียดและสกัดโดยใช้ตัวทำละลายคือ เอทานอล (ethanol) บริสุทธิ์ จากนั้นทำให้เข้มข้น โดยใช้วิธีการระเหยแห้ง (distillation in vacuum) โดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 °C ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) แล้วจึงเก็บไว้ในตู้เย็น (8 °C)

การนำสารสกัดหยาบมาทดสอบผลต่อหนอนและเซลล์ทำโดยชีววิธี (bioassay) ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นต่างกัน ทำได้โดยนำสารสกัดหยาบไปซั่งให้ได้น้ำหนักที่ต้องการแล้วนำไปละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น เอทานอลบริสุทธิ์ หรือน้ำกลั่น เป็นต้น

4. การทดสอบสารสกัดหยาบ

4.1 การทดสอบผลของสารสกัดหยาบต่อหนอนที่ใช้เป็นโมเดล

การทำ bioassay ทำได้โดยแยกหนอนตัวกลม *C. elegans* ออกมาจากวุ้นและแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆละประมาณ 30 ตัว แต่ละกลุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.0) 1 มล. บน

งานเลี้ยงพลาสติกสำเร็จขนาด 3.5 มม. เติมสารสกัดหยาบพืชที่ความเข้มข้นต่างกัน 4 ความเข้มข้น ลงไปในหลอดแต่ละกลุ่ม ในปริมาณ 20 ไมโครลิตร กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มควบคุมตัวทำลาย เติมตัวทำลาย (น้ำกลั่น หรือ เอทานอล) 20 ไมโครลิตร กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุมปกติ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.0) 20 ไมโครลิตร ปิดฝาจานแต่ละจาน และนำไปอบเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมานับจำนวนหนอนมีชีวิต (เคลื่อนไหว) และ หนอนตาย (ไม่เคลื่อนไหวเมื่อเคาะจานเลี้ยงแรงๆ) หากพบว่าหนอนไม่ตายเลย ก็ทำการทดลองซ้ำใหม่เช่นเดิม แต่เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบให้มากขึ้น หรือถ้าหากพบว่าหนอนตายทุกความเข้มข้น ก็ทำซ้ำเช่นกันแต่ลดความเข้มข้นสารสกัดหยาบลง หากพบว่ามีค่าร้อยละของหนอนที่ตายต่างกันมาก ก็เพิ่มจำนวนกลุ่มของหนอนให้มากขึ้นและเพิ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมกับจำนวนกลุ่มของหนอน ทำการทดลองจนได้ค่าร้อยละของการตายที่ใกล้เคียงกับ 50 และเลือกค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำ 3 ซ้ำ และนำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งให้หนอนตาย (inhibitory concentration) ร้อยละ 50 หรือ IC₅₀ ของพืชแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป probit analysis

สำหรับตัวอ่อนของหนอนปาราสิตใบไม้ในเลือดหรือ *Schistosoma mansoni* ในระยะ cercaria ได้ทำการทดลองในลักษณะเดียวกับการทดลองในหนอนตัวกลม โดยใช้จานทดสอบขนาด 24 หลุม (24 wells plate) ทั้งนี้การพิสูจน์ทราบการตายของ cercaria สามารถทำได้ง่ายกว่า เนื่องจากมีการเคลื่อนไหวหรือหยุดนิ่งที่ชัดเจน และสามารถตรวจสอบจำนวนทั้งหมดของหนอนได้แน่นอน โดยใช้ยา Lugol iodine และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ผ่าตัดสามมิติ

4.2 การทดสอบผลของสารสกัดหยาบต่อเซลล์คนและสัตว์

การนำสารสกัดที่มีผลต่อหนอนปาราสิต (ทำให้หนอนตายได้) มาทดสอบกับเซลล์เพื่อศึกษาคุณค่าทางยาโดยใช้ ดรรชนีการรักษา (therapeutic index) เป็นตัวชี้วัด ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบค่า IC₅₀ (50% effective concentration) ระหว่าง หนอน กับ เซลล์

SRB assay เพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์หยุดเจริญ (inhibition concentration) ร้อยละ 50 หรือ IC₅₀ ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งรายละเอียดของวิธีการดัดแปลงจาก Papazisis et al.(1997) ดังนี้

หลังจากละลายเซลล์ออกมาจากการแช่แข็งแล้ว ได้เลี้ยงเซลล์จนได้รุ่น (passage) ที่ 8 และใช้ในการทำ bioassay เพื่อการทดสอบกับสารสกัดหยาบจากพืชที่ได้กล่าวถึงเบื้องต้นไปแล้ว ความหนาแน่นของเซลล์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทำ cytotoxic assay ในจาน 96 หลุม คือ 5x10³ เซลล์/หลุม โดยทำเป็นสามซ้ำสำหรับแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้วางแผนในการทดลอง ทำการเติม sulforhodamine B (Sigma) หรือ SRB ที่มีความเข้มข้น 0.4% (w/v) ใน 1%

acetic acid solution โดยใช้ในปริมาณ 70µl จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้น
ดูด SRB ออกและล้างด้วยสารละลาย 1% acetic acid solution จำนวน 5 ครั้ง และวางไว้ให้
แห้งที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถเก็บจานไว้ได้หลังจากแห้งแล้ว จนกว่าจะพร้อมสำหรับขั้นตอน
ต่อไป เมื่อพร้อมแล้ว เติม สารละลาย unbuffered Tris-base solution (Sigma) เข้มข้น 10mM
ปริมาณ 200 µl เพื่อละลาย SRB ที่ติดอยู่ในเซลล์ และนำไปวางบนเครื่องเขย่าจานเป็นเวลา
ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่องอ่านจาน (Anthos-2001, Anthos labteck) ที่ความ
ยาวคลื่นแสง 492 nm โดยตัดแสงฉากหลังที่ 620 nm ค่า optical density (OD) ที่อ่านได้จากแต่
ละหลุมจึงเป็นค่าการดูดกลืนแสงของหลุมนั้นๆ แล้วนำค่ามาลบออกด้วยค่า blank (ซึ่งเป็น
ค่าเฉลี่ยของ OD ของหลุมฉากหลังจำนวน 3 หลุม) สำหรับค่าอัตราส่วนความรบกวนคลื่นที่
เรียกว่า signal-to-noise ratio (หรือ S/N) เป็นค่าจากสมการ $S/N = (\text{mean test OD} + \text{blank}) / \text{blank}$

สำหรับ MTT assay ได้ใช้น้ำยาสำเร็จจาก SIGMA ซึ่งสามารถทำการทดสอบได้โดย
ติดตามจากคู่มือที่ได้รับพร้อมกับชุดน้ำยา

ค่า OD ที่ได้นำมาคำนวณย้อนกลับให้เป็นจำนวนเซลล์ และหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม
Probit analysis ตามวิธีการของ Sukuma (1998)

4.3 การทดสอบผลของสารสกัดหยาบต่อหอยพาหะของ *Schistosoma mansoni*

จากผลของข้อ 4.1 ทำการคัดเลือกเอาสารสกัดหยาบจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งตัวอ่อน
ระยะ cercaria ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ไปทดสอบดูผลต่ออัตราการเดินของหัวใจของ
หอย *Biomphalaria glabrata* ที่เป็นเจ้าบ้านกึ่งกลางของ *S. mansoni* โดยทดสอบในหอย 4
กลุ่ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำตัวใกล้เคียงกัน ประมาณ 8-10 mm. กลุ่มละ 3-5 ตัว โดย
นับการเดินของหัวใจในเวลา 1 นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบผ่าตัด ซึ่งสามารถมองเห็นการ
เดินของหัวใจหอยได้เนื่องจากมีเปลือกบางโปร่งแสง จากนั้นนำจำนวนครั้งที่นับได้จากแต่ละตัว
มาหาค่าเฉลี่ยรวมทุกกลุ่ม เป็นค่าอัตราการเดินของหัวใจหอยก่อนได้รับสาร (pre-exposure)
เมื่อเสร็จแล้วนำหอยแต่ละกลุ่มไปใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 ml แยกกัน แต่ละบีกเกอร์มีน้ำสะอาด
บีกเกอร์ละ 10 ml ผสมสารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นของสารที่เหมาะสม
โดยใช้ตัวทำละลาย (คือเอทานอล หรือน้ำกลั่น) ไม่เกิน 20 µl นั่นคือมีความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละ
บีกเกอร์ โดยประมาณเท่ากับค่า IC_{50} ของสารสกัดที่ได้เลือกไว้แล้ว สำหรับกลุ่มควบคุมที่ 1
เติมน้ำกลั่น 20 µl ส่วนกลุ่มควบคุมที่ 2 เติมเอทานอล 20 µl จากนั้นตั้งการทดลองไว้ที่
อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนับอัตราการเดินของหัวใจของหอยแต่ละตัวอีกครั้งหนึ่ง
นำมาหาค่าเฉลี่ย เป็นค่าอัตราการเดินของหัวใจหอยหลังได้รับสาร (post-exposure) หลังจาก

นั้นจึงนำหอยแต่ละกลุ่มไปเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ในบีกเกอร์ 50 ml แต่ละบีกเกอร์มีน้ำสะอาด 10 ml เพียงอย่างเดียว (คือน้ำประปาที่เปิดขังไว้ในถังพลาสติกเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง) แล้วจึงนับอัตราการเต้นของหัวใจอีกครั้งหนึ่งเพื่อทดสอบว่าหอยสามารถมีอัตราการเต้นของหัวใจเข้าสู่ภาวะปกติเหมือนเดิมหรือไม่ (recover stage)

4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางด้านพันธุพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์มนุษย์

ฤทธิ์ทางด้านพันธุพิษ หรือ genotoxicology หมายถึงการออกฤทธิ์ของสารใดๆที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อสารพันธุกรรมของเซลล์ซึ่งจะมีผลต่อการแสดงออกของพันธุกรรมนั้นซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุของโรคทางพันธุกรรม หรืออาจมีผลต่อการทำงานของเซลล์จนทำให้เกิดมีความผิดปกติขึ้นได้ โดยทั่วไปมักจะเป็นการตรวจดูการแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) โดยใช้ดัชนีการแบ่งตัวที่เรียกว่า mitotic index หรือ MI ซึ่งเป็นค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในขณะใดขณะหนึ่ง โดยทำการนับจำนวนประชากรของเซลล์ไม่น้อยกว่า 1,000 เซลล์ขึ้นไป ซึ่งเป็นค่าที่ต้องใช้ในการเปรียบเทียบกับค่า MI ของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะปกติหรือเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบใดๆ นอกจากนี้ยังอาจจะมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าร้อยละของการแบ่งเซลล์ หรือที่เรียกว่า percentage of decreasing of mitotic index หรือ P-D.M.I. ซึ่งสามารถหาค่าได้จากรายละเอียดในสมการข้างล่างนี้

$$\begin{aligned} \text{P-D.M.I.} &= (\text{MI}_{\text{control}} - \text{MI}_{\text{treatment}}) \times 100 / \text{MI}_{\text{control}} \\ \text{change of MI} &= \text{MI}_{\text{control}} - \text{MI}_{\text{treatment}} \\ \text{MI} &= \text{metaphase cells in } 1,000 \text{ cells} \times 100 / 1,000 \end{aligned}$$

ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซม หรือที่เรียกว่า chromosome aberration ซึ่งเกิดจากการที่โครโมโซมมีรูปร่างผิดปกติไปโดยใช้เซลล์ AMC-K46 เป็นโมเดล สารสกัดที่ใช้จะได้รับการคัดเลือกแล้วว่าออกฤทธิ์สูงสุดต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ ดังกล่าวแล้วข้างต้น ซึ่งในที่นี้ คือสารสกัดจากผลอ่อนของ *A. reticulata* ผลอ่อนของ *A. squamosa* และ จากใบของ *M. fruticosum* ทำการเลี้ยงเซลล์ในจานขนาด 10 cm² โดยเฉพาะเซลล์จำนวน 1x10⁵ เซลล์ต่อจาน หลังจากเพาะแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มเลือกจานเป็นกลุ่มๆ ละ 3 จานมาเติมสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดที่ทำการเจือจางในปริมาณที่เหมาะสม โดยมีกลุ่มจานที่เติม DMSO และ mitomycin C (MMC) 0.5 ug/ml เป็นกลุ่มควบคุมตัวทำลาย (solvent control) และ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) ตามลำดับ หลังจากบ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาย้อมสีโครโมโซมเพื่อตรวจสอบความผิดปกติ โดยใช้วิธีการย้อมจากกระบวนการของ Klangsinrikul (2003) ซึ่งมีรายละเอียดโดยย่อคือ โครโมโซมของเซลล์ใน

ระยะเมตาเฟส (metaphase) ที่กระจายตัวบนกระจกสไลด์ตามวิธีการมาตรฐานโดยทั่วไปแล้ว มีการย้อมสีแบบ non-banding technique โดยใช้ 10% Giemsa ใน Weise phosphate buffer นาน 10 นาที จากนั้นนับและประเมิน MI และ P-D.M.I. ตามที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น นอกจากนี้ยังมีการตรวจนับเมตาเฟสที่มีความผิดปกติของโครโมโซมอีกด้วย



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง

1. พืชที่รวบรวมได้ในทั้งสองวงศ์ คือ Annonaceae และ Rubiaceae ประกอบด้วย 15 ชนิดดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยส่วนของพืชที่เก็บแทบทุกชนิดคือใบ และพืชบางชนิดเก็บส่วนของกิ่งและลำต้นด้วย สำหรับผลอ่อนเก็บจากพืชสองชนิดคือ *A. squamosa* และ *A. reticulate*

ตารางที่ 1 พืชที่เก็บตัวอย่างมาเพื่อการคัดกรองเบื้องต้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านหนองปราลิตและต่อต้านเซลล์มะเร็ง หมายเลขกำกับตัวอย่าง (voucher number) ได้จากการจำแนกชนิดและเก็บแบบของตัวอย่างที่หอพรรณไม้และที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเซลล์มนุษย์และสัตว์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สังเกตส่วนของพืชที่นำมาสกัดเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) โดยที่พืชสิบชนิดแรกเป็น Annonaceae ส่วนอีกห้าชนิดถัดมาเป็น Rubiaceae

Plant species และชื่อไทย	Voucher no.	Parts extracted
<i>Annona squamosa</i> น้อยหน่า	CMU 027161	young fruit, leaf
<i>Annona muricata</i> ทูเรียนเทศ	CMU-AL 017	leaf
<i>Annona reticulate</i> น้อยหน่อง	CMU-AL 013	young fruit, seed, leaf
<i>Annona siamensis</i> การเวก	CMU 027155	leaf
<i>Artabotrys odoratissimus</i> กระดังงาจีน	CMU-AL 012	leaf, fruit, bark
<i>Cananga odorata</i> กระดังงาไทย	CMU 027156	leaf
<i>Melodorum fruticosum</i> ลำดวน	CMU-AL 015	leaf
<i>Melodorum siamensis</i> นมแมว	CMU 027154	leaf
<i>Uvaria rufa</i> นมควาย	CMU-AL 014	leaf, bark
<i>Desmos chinensis</i> สายหยุด	CMU 027157	leaf
<i>Ixora ebarbata</i> เข็มขาว	CMU-AL 011	leaf
<i>Ixora lobbii</i> เข็มแดง	CMU 027160	leaf
<i>Paederia linearis</i> กระพังโหมตัวผู้	CMU 027158	leaf, stem
<i>Paederia foetida</i> กระพังโหมตัวเมีย	CMU-AL 016	leaf, stem
<i>Kopsia fruticosa</i> พุดชมพู	CMU 027159	leaf

เนื่องจากสารสกัดหยาบที่ได้จากพืชแต่ละชนิด หลังจากผ่านกระบวนการ freeze-dry แล้วมีลักษณะต่างกันอยู่บ้างโดยที่ส่วนใหญ่สามารถทำเป็นผงแห้งสนิทได้ แต่มีบางชนิดที่เป็นตะกอนสารเหนียวและไม่สามารทำให้แห้งสนิทได้แม้จะผ่านกระบวนการ freeze-dry แล้วมากกว่า 1 ครั้งก็ตาม จึงได้เก็บในลักษณะเป็นสารเหนียวเข้มข้นที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยสารทั้งหมดเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่ -20°C ก่อนนำมาใช้งาน

2. เมื่อทำการทดสอบสารสกัดหยาบที่ได้กับหนอน และเซลล์แล้วได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า IC₅₀ ของการออกฤทธิ์ต่อต้านหนอนตัวกลม (anti-nematode) ต่อต้านตัวอ่อนพยาธิใบไม้เลือด (anti-schistosome cercaria) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากพืช ค่าตัวเลขที่แสดงมีปริมาณเป็น ug/ml อักษรย่อที่ใช้สำหรับ ส่วนของพืชมีความหมายดังนี้ B-bark หรือ เปลือกต้น, L-leave หรือใบ, Sd-seed หรือเมล็ด, St-stem หรือ ส่วนลำต้น และ YF-young fruit หรือส่วนผลอ่อน สำหรับอักษรย่อเกี่ยวกับสารตัวทำละลาย (solvent) คือ E-ethanol หรือ เอทานอล, W-water (aqueous) หรือน้ำกลั่น; * แสดงระดับค่าของ IC₅₀ ที่ถือว่าไม่ออกฤทธิ์ โดย *=100-500, **= >500-5,000, ***= >5,000-10,000, ****= >10,000-50,000, และ *****= >50,000 ug/ml; NE = no experiment taken in this research.

plant species	part	solvent	<i>C. elegans</i>	<i>S. mansoni</i>	MCF-7	Hela	M44
<i>A. muricata</i>	L	E	*****	*****	*****	NE	*****
	YF	E	12.4	1.1	26.8	7.6	***
	YF	W	86.4	***	80.2	30.9	****
	Sd	W	*(164.2)	**	*(269.9)	*(126.6)	****
<i>A. reticulata</i>	L	E	5.2	35.7	8.8	25.8	***
	L	W	17.3	***	25.3	*(103.6)	****
	B	E	17.0	**	43.3	84.8	****
	B	W	25.0	****	*(135.8)	*(283.9)	**
<i>A. siamensis</i>	L	E	*****	*****	NE	NE	*****
	YF	E	14.1	0.4	23.6	53.8	***
<i>A. squamosa</i>	L	E	*(193.2)	**	39.3	4.3	****
	L	W	*(198.4)	****	NE	NE	NE
	YF	E	81.1	***	*(170.1)	*(106.0)	**
	YF	W	49.0	***	*(274.6)	*(161.9)	**
<i>A. odoratissimus</i>	L	E	*(135.2)	***	NE	NE	***
	L	W	72.1	**	86.7	93.0	**
	B	E	****	****	NE	NE	****
<i>C. odorata</i>	L	E	*****	*****	*****	NE	*****
<i>M. fruticosum</i>	L	E	*****	*****	NE	NE	*****
<i>M. siamensis</i>	L	E	*****	*****	*****	NE	*****
<i>U. rufa</i>	L	E	*****	*****	NE	NE	NE
	B	E	*****	*****	*****	NE	*****
<i>D. chinensis</i>	L	E	****	*****	NE	NE	NE
<i>I. ebarbata</i>	L	E	****	****	*****	*****	*****
<i>I. lobbia</i>	L	E	11.0	***	*(107.5)	*(194.6)	****
<i>P. linearis</i>	L	E	*****	*****	*****	*****	*****
	St	E	***	*****	*****	*****	NE
<i>P. foetida</i>	L	E	*****	*****	*****	*****	*****
	St	E	27.2	**	*****	*****	*****
<i>K. fruticosa</i>	L	E	*(316.5)	*****	*****	*****	*****
Praziquantel	SIGMA P4668	E	*(425.8)	*(156.7)	**	***	***
Ellipticine	SIGMA E3380	DMSO	NE	NE	18.7	12.3	39.5

จากตารางที่ 2 จะเห็นว่ามีสารสกัดจำนวน 17 จากทั้งหมด 30 ตัวอย่างที่มีผลออกฤทธิ์ กำจัดหนอนตัวกลม *C. elegans* โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 5.2 – 316.5 ug/ml ในเวลา 3 ชั่วโมงของการได้รับสาร ในที่นี้อาจจำแนกระดับของการออกฤทธิ์เป็น 4 ระดับ คือ (1) ดีที่สุด (2) ดี (3) ปานกลาง และ (4) ไม่ออกฤทธิ์หรือมีฤทธิ์น้อยมาก โดยให้ค่า IC_{50} ตามลำดับเป็น ≤ 1 ; $>1 - 20$; $>20 - 100$; และ >100 ug/ml ในที่นี้เพื่อให้การพิจารณาข้อมูลในตารางที่ 2 ทำได้ง่าย จึงได้แปลงค่า IC_{50} ที่มีค่า >100 ซึ่งถือว่าไม่ออกฤทธิ์ทั้งต่อหนอนและเซลล์ทุกชนิด ให้เป็น 5 ระดับโดยแทนด้วยจำนวน ดอกจันทร์ * และในการทดลองตามสภาพความเป็นจริง สารสกัดบางตัวที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อหนอน ก็จะไม่ได้นำมาทำการทดสอบต่อเซลล์มะเร็ง แต่โดยส่วนใหญ่จะมีการทดสอบกับเซลล์ปกติคือ M44

เมื่อพิจารณาการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อหนอน พบว่าสารสกัดจากพืชในวงศ์ Annonaceae ได้แก่ *A. reticulate*, *A. squamosa*, และ *A. odoratissima* นั้นแสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มในการเลือกออกฤทธิ์ (selective activity) ที่จะกำจัดหนอนตัวกลม *C. elegans* ได้ดีกว่าตัวอ่อนของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ซึ่งเป็นหนอนตัวแบน สารสกัดโดยใช้เอธานอลจากผลอ่อนของ *A. reticulate* และ *A. squamosa* แสดงให้เห็นการออกฤทธิ์ที่ดีที่สุดต่อตัวอ่อนของ *S. mansoni* ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.4 และ 1.1 ug/ml ตามลำดับ สารสกัดหยาดนี้แสดงค่าการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าของยาถ่ายพยาธิ praziquantel ซึ่งในการทดลองนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารที่แสดงการออกฤทธิ์ที่น้อยมากหรือแทบจะไม่มีฤทธิ์เลย ด้วยค่า IC_{50} เพียง 425.8 และ 156.7 ug/ml ต่อ *C. elegans* และ *S. mansoni* ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากพืชทั้งสามชนิดดังกล่าวข้างต้นได้แสดงค่าการออกฤทธิ์ที่สูงกว่า (ค่า IC_{50} น้อยกว่า) ของ praziquantel อย่างเห็นได้ชัด สำหรับการออกฤทธิ์ต่อหนอน *C. elegans* นั้น มีค่า IC_{50} ที่น่าสนใจถึง 12.4 และ 14.1 ug/ml จากสารสกัดผลอ่อนของ *A. reticulate* และ *A. squamosa* ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากพืชอื่นในวงศ์เดียวกัน คือ *A. muricata* และ *A. siamensis* แสดงผลการกำจัดหนอนที่น้อยมากหรือแทบไม่มีการออกฤทธิ์เมื่อเทียบกับพืชสามชนิดแรกที่ถูกกล่าวถึงตอนต้น สำหรับพืชสองชนิดจากวงศ์ Rubiaceae คือ *I. lobbia* (สารสกัดโดยเอธานอลจากใบ) และ *P. foetida* (สารสกัดเอธานอลจากลำต้น) แสดงให้เห็นความจำเพาะในการออกฤทธิ์ยับยั้ง *C. elegans* ได้มากกว่า ตัวอ่อนของ *S. mansoni* ทั้งนี้โดยการพิจารณาจากอัตราส่วนของ IC_{50} ที่มีค่า 11.0 และ 27.2 ug/ml ซึ่งแสดงว่าออกฤทธิ์ดีกว่าค่า IC_{50} ที่ $> 5,000$ ug/ml ตามลำดับ สำหรับแนวโน้มทางเภสัชรักษา หรือที่เรียกว่า pharmacotherapeutic tendencies ที่จัดว่ามีการออกฤทธิ์สูงของสารสกัด คือมีค่า $IC_{50} < 100$ ug/ml เมื่อพิจารณาการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติ M44 ควบคู่ไปด้วยเป็นอัตราส่วนของค่า IC_{50} จะได้ค่าดัชนีชี้วัดความจำเพาะในการออกฤทธิ์ ที่เรียก selective index หรือ SI ซึ่งในที่นี้สามารถเขียนเป็นอัตราส่วนได้คือ

$$SI \text{ ของสารสกัดใดๆ} = IC_{50} \text{ ของสารนั้นต่อหนอนหรือเซลล์} \div IC_{50} \text{ ของสารสกัดนั้นต่อ M44}$$

จากอัตราส่วนของ SI ดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าเป็นการศึกษาเปรียบเทียบในการคัดกรองเบื้องต้นที่จะสามารถทำให้ชี้ชัดได้ว่าสารสกัดที่สนใจมีการออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งหรือปาลาติเตป้าหมายได้ดีกว่าเซลล์ปกติซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายที่อาจได้รับผลกระทบจากสารออกฤทธิ์หรือไม่ ดังนั้นในการศึกษาการคัดกรองเบื้องต้น (screening) หากพบว่าค่า SI ของสารสกัดใดมีค่า < 1 หมายความว่า สารสกัดนั้นน่าจะมีคุณสมบัติในการนำมาใช้ในการรักษาได้ดี และน่าจะมีผลข้างเคียงต่อการรักษาน้อย และจากค่า IC_{50} ในตารางที่ 2 นี้สามารถคาดเดาแนวโน้มได้ว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *A. reticulata*, *A. squamosa*, *I. lobbiai* และ *P. foetida* มีแนวโน้มทางเภสัชรักษาที่ดีมากในการนำมาเป็นยากำจัดหรือป้องกันหนอนพยาธิได้

เมื่อพิจารณาการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง จากตารางที่ 2 จะเห็นว่า เซลล์สายพันธุ์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้รับผลของของสารสกัดจากพืชใน genus *Annona* ค่อนข้างมากโดยมีค่า IC_{50} เป็นช่วงระหว่าง 23.6 – 269.9 ug/ml และสำหรับ HeLa ได้รับผลมากกว่าด้วยค่า IC_{50} ระหว่าง 4.3 – 283.9 ug/ml ที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือสารสกัดของพืชแทบทั้งหมดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ M44 ทำให้ค่า IC_{50} มีค่ามากกว่า 500 ug/ml ขึ้นไป ซึ่งทำให้เป็นที่แน่ชัดเมื่อพิจารณา ค่า SI ว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งแทบทั้งหมด มีความจำเพาะค่อนข้างสูงในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้มากกว่าเซลล์ปกติ และมีแนวโน้มทางเภสัชรักษามะเร็งที่ดี นั่นคือ SI ratio มีค่า < 1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจาก *A. reticulata*, *A. squamosa*, *A. odoratissimus* และ *I. lobbiai* น่าจะให้ผลที่ดีกว่า เพราะค่า SI น้อยกว่า 1 มากๆ เมื่อเปรียบเทียบกับยา ellipticine ซึ่งมีค่า SI เพียงประมาณ 0.5 เท่านั้น

จากการพิจารณาการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันสองแบบคือ เอทานอล และน้ำ พบว่าการสกัดสารจากพืชชนิดเดียวกันด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันไม่ได้ให้ผลที่เป็นแนวโน้มของการออกฤทธิ์ที่มีแบบแผนชัดเจนต่อทั้งหนอนและเซลล์ กล่าวคือ สารสกัดเอทานอลจากพืชสองชนิดคือ *A. reticulata* และ *A. squamosa* แสดงให้เห็นว่ามีการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ เมื่อพิจารณาจากส่วนของพืชที่ใช้สกัดส่วนเดียวกัน เพื่อให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้นขอยกตัวอย่างจาก *A. reticulata* ซึ่งมีค่า IC_{50} ของสารสกัดผลอ่อนด้วยเอทานอล เรียงตามลำดับคือ *C. elegans*, *S. mansoni*, MCF-7 และ HeLa เป็น 12.4, 1.1, 26.8 และ 7.6 ug/ml ซึ่งแสดงว่ามีการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเดียวกันของพืช ซึ่งมีค่า IC_{50} สูงกว่า คือ 86.4, $> 5,000$, 80.2 และ 30.9 ug/ml ในขณะที่ สารสกัดด้วยเอทานอลจากผลอ่อนของ *A. reticulata* มีความจำเพาะในการยับยั้ง *C. elegans* มากกว่า *S. mansoni* ด้วยค่า IC_{50} เป็น 12.4 และ 1.1 ug/ml ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่ามีความตรงข้ามกับสารสกัดด้วยน้ำที่มี IC_{50} เป็น $> 5,000$ และ 86.4 ug/ml ตามลำดับ ยังมีสาร

สกัดด้วยเอทานอลจากผลอ่อนของ *A. squamosa* ซึ่งแสดงความจำเพาะในการยับยั้ง MCF-7 มากกว่า HeLa ด้วยค่า IC_{50} เป็น 23.6 และ 53.8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แต่ในทางกลับกัน สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกลับแสดงให้เห็นการยับยั้งในทางตรงข้ามด้วยค่า IC_{50} เป็น 39.3 และ 4.3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นี่อาจจะเป็นการแสดงให้เห็นว่า ในส่วนต่างๆของพืชนั้น มีสารออกฤทธิ์ต่างชนิดกัน และอาจจะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันได้

มีประเด็นที่น่าสนใจอีกสองประเด็น คือ (1) จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในขณะทำการทดลอง พบว่าตัวอ่อน cercaria ของ *S. mansoni* ที่ได้รับพิษของ *A. reticulata* และ *A. squamosa* และตายแล้วมีลักษณะซากที่ทุกซากทางหลุดออกจากส่วนหัว และที่ผิวของทั้งหัวและหางมีถุงเล็กๆยื่นออกมาจำนวนมาก (skin bubbles) และผิวมีลักษณะเปื่อยยุ่ยหลุดออกมา ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการออกฤทธิ์ต่อทั้งระบบประสาทอย่างน้อยก็ในส่วนของควบคุมการหดตัว และมีการเข้าทำลายเซลล์ที่ผิวของพยาธิโดยตรง แต่อย่างไรก็ตามไม่พบลักษณะผิวที่ถูกย่อยเช่นนี้ในหนอนตัวกลม ซึ่งอาจมี cuticle ที่หนากว่าคอยป้องกันอยู่ อีกประเด็นหนึ่ง (2) หากสังเกตจากตารางที่ 2 จะพบว่า สารสกัดที่ไม่มีผลในการออกฤทธิ์ต่อหนอน ก็มักจะไม่มีออกฤทธิ์ต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งที่ใช้ในการทดลองนี้ด้วย ซึ่งได้แก่สารสกัดจาก *C. odorata*, *M. fruticosum*, *M. siamensis*, *U. rufa*, *D. chinensis*, *I. ebarbata* และ *P. linearis*

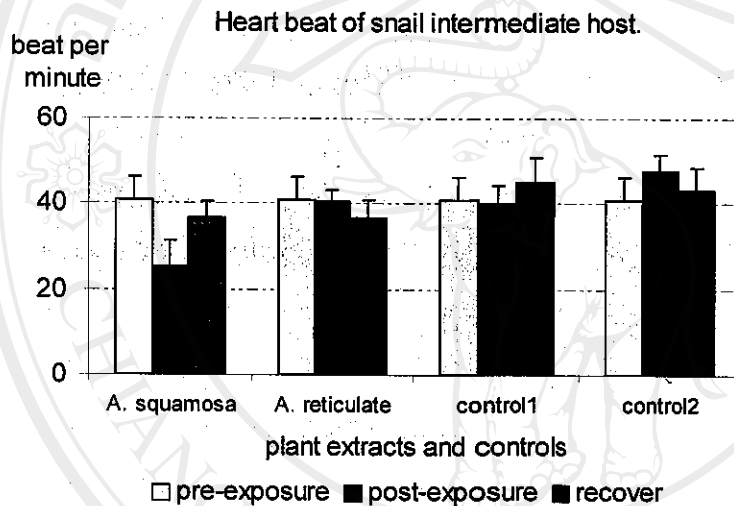
3 การทดสอบผลของสารสกัดหยาบต่อหอยพาหะของ *Schistosoma mansoni*

จากการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดสองชนิดคือ สารสกัดจากผลอ่อนของ *A. squamosa* และ *A. reticulata* ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งหอย (molluscicidal activity) โดยทำการทดสอบกับหอย *B. glabrata* พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดไม่มีฤทธิ์นี้ โดยให้ค่า IC_{50} ที่สูงมากกว่า 5,000 $\mu\text{g/ml}$ นั่นคือไม่ได้ทำให้หอยตายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพียงแต่หอยมีอาการเซื่องซึมเคลื่อนที่ได้ช้าลงในระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีค่าสูงกว่า 947.3 $\mu\text{g/ml}$ แต่หลังจากนั้นเมื่อนำกลับมาเลี้ยงในน้ำสะอาดภายในอีก 24 ชั่วโมงต่อมาก็สามารถกลับฟื้นมา มีสภาพที่เหมือนเดิมและกินอาหารได้ตามปกติ

นอกจากนี้ยังมีการนำเอาสารสกัดจากผลอ่อนของพืชสองชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง cercaria คือ *A. squamosa* และ *A. reticulata* ไปทดสอบดูผลต่ออัตราการเดินของหัวใจของหอย *B. glabrata* โดยผสมสารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นของสารที่ทำให้ cercaria ตาย 100% หรือคือค่า IC_{100} สำหรับ cercaria โดยประมาณ คือ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ และ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่ง สำหรับกลุ่มควบคุมที่ 1 เติมน้ำกลั่น 20 μl ส่วนกลุ่มควบคุมที่ 2 เติมเอทานอล 20 μl จากนั้นตั้งการทดลองไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับอัตราการเดินของหัวใจของ

หอยแต่ละตัวในระยะ pre-exposure, post-exposure และ recover stage ปรากฏผลดังกราฟในภาพที่ 1

จะเห็นว่าสารสกัดที่มีผลต่อการลดอัตราการเต้นของหัวใจหอยอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) คือ สารสกัดจาก *A. squamosa* โดยมีค่าเฉลี่ยการเต้นของหัวใจ post-exposure ที่ 25.3 ครั้งต่อนาที ซึ่งน้อยกว่า pre-exposure ที่ 40.8 ครั้งต่อนาที แต่หอยสามารถมีอัตราการเต้นของหัวใจเข้าสู่ภาวะปกติ คือ recover หลังจากนั้นที่ 36.5 ครั้งต่อนาที ส่วนสารสกัดจาก *A. reticulate* นั้นไม่มีผลต่อการเต้นของหัวใจหอยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งในกลุ่มที่ได้รับเอธานอล (control 2) อัตราการเต้นของหัวใจสูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เติมน้ำกลั่น (control 1) post-exposure ที่ 47.7 และ 40.3 ครั้งต่อนาที ตามลำดับ



ภาพที่ 1 แสดงการเต้นของหัวใจหอยในระยะต่างๆที่ได้รับสารสกัดหยาบจากพืชสองชนิด คือ *A. squamosa* และ *A. reticulate* สำหรับ control1 และ control2 คือ กลุ่มที่ได้รับ น้ำกลั่น และ เอธานอลตามลำดับ ในที่นี้ pre-exposure, post-exposure และ recover หมายถึง ระยะก่อนการได้รับสาร หลังจากได้รับสารแล้ว 24 ชั่วโมง และ ระยะหลังจากนำหอยออกจากสารที่ได้รับและใส่น้ำสะอาด ส่วนเส้นบนยอดกราฟแต่ละแท่งเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สำหรับค่า pre-exposure นั้นเป็นค่าเฉลี่ยของหอยทุกกลุ่ม

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางด้านพันธุพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์มนุษย์

จากการหาค่า IC_{50} ของสารสกัดจากพืช 5 species ต่อเซลล์ AMC-K46 และ HeLa โดยวิธี MTT assay ได้ผลดังที่ได้แสดงในตารางที่ 3 ได้มีการใช้ค่า SI ในการประเมินผลด้วย ซึ่งจะเห็นได้ว่า สำหรับเซลล์ AMC-K46 สารสกัดที่ให้ค่าออกฤทธิ์สูงสุดเป็นสารสกัดที่มาจากใบของ *M. fruticosum* โดยมีค่า IC_{50} เป็น 10.48 และ 4.39×10^2 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ เซลล์ที่แบ่งตัวและเซลล์ที่ไม่

แบ่งตัวตามลำดับ ซึ่งให้ความหมายว่า สารสกัดนี้มีความเจาะจงหรือความจำเพาะที่จะยับยั้งเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) มากกว่าเซลล์ที่ไม่แบ่งตัวหรือเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก (non-dividing หรือ resting cells) ซึ่งในที่นี้ประมาณค่า SI ได้น้อยกว่า 1 มาก คือ 0.024 การออกฤทธิ์ปานกลางนั้นได้แก่สารสกัดจากผลอ่อนของ *A. squamosa* ด้วยค่า IC_{50} ที่ใกล้เคียงกัน คือ 53.70 และ 43.75 ug/ml สำหรับเซลล์ที่แบ่งตัวและเซลล์ที่ไม่แบ่งตัวตามลำดับ จากค่า IC_{50} ที่ใกล้เคียงกันนี้แสดงว่าสารสกัดนี้ไม่มีความจำเพาะในการเลือกยับยั้งเซลล์แบ่งตัวและไม่แบ่งตัว หรือสามารถทำลายเซลล์ทั้งสองระยะได้เท่าๆกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า SI แล้วจะเห็นว่ามีความมากกว่า 1 ($53.70 / 43.75 = 1.23$) สารสกัดอื่นนอกเหนือจากนี้มีผลที่แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ในการทดลองนี้ เพราะมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ug/ml และจะไม่ใช้ในการทดลองนี้อีก

ตารางที่ 3 แสดงค่า IC_{50} และ SI ของสารสกัดเอทานอลจากพืชที่ศึกษาต่อเซลล์ที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัว ค่า SI ของแต่ละเซลล์เชื้อสายคำนวณโดยอัตราส่วนระหว่าง IC_{50} -dividing / IC_{50} -non-dividing และในส่วนของความหนาแน่นของเซลล์เป็นอัตราส่วนของ IC_{50} -HeLa / IC_{50} -AMC-K46 อักษรย่อ lv-leaves, sb-stem bark, yf-young fruit และ NAc-no activity

Plant species	IC_{50} μ g/ml				selective index (SI)			
	AMC-K46 dividing	AMC-K46 non-dividing	HeLa dividing	HeLa non-dividing	AMC-K46	HeLa	dividing	non-dividing
<i>A. reticulata</i> (yf.)	2.99×10^3	3.76×10^6	0.86	21.0	NAc	0.041	2.8×10^{-5}	5.5×10^{-6}
<i>A. reticulata</i> (lv.)	1.21×10^2	1.54×10^3	61.59	96.3	NAc	0.640	0.51	0.063
<i>A. reticulata</i> (sb.)	3.70×10^2	2.25×10^3	7.26×10^5	1.73×10^4	NAc	NAc	NAc	NAc
<i>A. squamosa</i> (yf.)	53.70	43.75	5.25	59.24	NAc	0.089	0.098	0.739
<i>A. squamosa</i> (lv.)	1.22×10^2	2.06×10^4	82.30	1.01×10^2	NAc	0.815	0.675	NAc
<i>C. odorata</i> (lv.)	1.06×10^4	3.55×10^5	1.01×10^4	1.15×10^7	NAc	NAc	NAc	NAc
<i>C.o. fruticosa</i> (lv.)	3.64×10^2	1.21×10^3	74.90	2.86×10^3	NAc	0.028	0.206	NAc
<i>M. fruticosum</i> (lv.)	10.48	4.39×10^2	13.90	1.54×10^2	0.024	0.090	0.754	NAc

สำหรับผลต่อเซลล์ HeLa มีสารสกัดสามตัวที่แสดงการออกฤทธิ์ที่ดีต่อเซลล์ที่แบ่งตัวคือ จากผลอ่อนของ *A. reticulata*, *A. squamosa* และจากใบของ *M. fruticosum* โดยมีค่า IC_{50} เป็น 0.86, 5.25 และ 13.90 ug/ml ตามลำดับ สารสกัดอีกสามตัวแสดงการออกฤทธิ์ในระดับปานกลางต่อเซลล์แบ่งตัว ได้แก่ *A. reticulata* (ใบ) *A. squamosa* (ใบ) และ *C.odorata* var *fruticosa* (ใบ) โดยค่า IC_{50} เป็น 61.59, 82.30 และ 74.90 ug/ml ตามลำดับ สำหรับเซลล์ HeLa ที่ไม่แบ่งตัวมีสารสกัดสามตัวที่ออกฤทธิ์ปานกลางด้วยค่า IC_{50} เป็น 21.0, 96.3 และ 59.24 ug/ml จาก *A. reticulata* (ผลอ่อน) *A. reticulata* (ใบ) และ *A. squamosa* (ผลอ่อน) ตามลำดับ สารสกัดจาก *A. reticulata* (ผลอ่อน) *A. squamosa* (ผลอ่อน) *C.odorata* var *fruticosa* (ใบ) และ *M. fruticosum*

(ใบ) แสดงการออกฤทธิ์อย่างจำเพาะในการเลือกยับยั้งเซลล์แบ่งตัวมากกว่าเซลล์ไม่แบ่งตัวด้วยค่า SI น้อยกว่า 1 ส่วนสารสกัดอีก 2 ตัวแสดงการออกฤทธิ์ปานกลางถึงน้อยมากต่อเซลล์แบ่งตัว นั่นคือ *A. reticulate* (ใบ) และ *A. squamosa*(ใบ) ด้วยค่า SI ที่น้อยกว่า 1 ไม่มากนัก คือ 0.64 และ 0.81 ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบพันธุพิษ หรือ genotoxic test นั้นได้ผลจากการศึกษาที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การทดสอบผลของสารต่อการแบ่งตัวของเซลล์โดยดูจากครรชนีการแบ่งตัว หรือ mitotic index หรือ MI และ P-D.M.I. ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4 ซึ่งจะเห็นว่า สารสกัดจากผลอ่อนของ *A. reticulate* และ *A. squamosa* แสดงค่า MI (0.75 และ 0.93 ตามลำดับ) ที่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญจาก MMC (1.63) ซึ่งหมายความว่าสารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์นั่นเอง ส่วนสารสกัดจากใบของ *M. fruticosum* แสดงค่า MI ที่เท่ากับที่นับได้จากเซลล์ที่ได้รับ DMSO คือ 4.36 และใกล้เคียงกับที่ได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ 4.84 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จึงสามารถระบุได้ว่าสารสกัดนี้ไม่มีผลต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส เมื่อพิจารณาค่า P-D.M.I. ที่ได้จากการคำนวณผลของสารสกัดจาก *A. reticulate*, *A. squamosa* และ *M. fruticosum* มีค่าเป็น 84.6, 80.9 และ 10.2 ตามลำดับ จะเห็นว่า P-D.M.I. สองค่าแรกที่เป็นผลจาก *A. reticulate* และ *A. squamosa* สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญจากในเซลล์กลุ่มที่ได้รับ DMSO ซึ่งมีค่า P-D.M.I. เพียง 10.0 ซึ่งหมายความว่าสารสกัดทั้งสองนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างเห็นได้ชัด และสารสกัดทั้งสองยังแสดงค่า P-D.M.I. ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากเซลล์ที่ได้รับ MMC ซึ่งมีค่า P-D.M.I. เป็น 66.3 ส่วนสารสกัดจาก *M. fruticosum* แสดงค่า P-D.M.I. ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ DMSO ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีการยับยั้งการแบ่งเซลล์เนื่องจากผลของสารสกัดนี้

ตารางที่ 4 แสดงค่าพันธุพิษ (genotoxicity) และความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) ของสารสกัดเอธานอลจากพืชที่ศึกษาต่อเซลล์ AMC-K46 อักษรย่อ Ab.met.-number of aberration metaphase, Sc.met.-number of screen metaphase, PAM-percentage of aberrant metaphase, ace-acentric fragment, ctb-chromatid break, ctd-chromatid deletion และ ctg-chromatid gap

	medium	DMSO	MMC	<i>A. reticulate</i>	<i>A. squamosa</i>	<i>M. fruticosum</i>
M.I. (±SD)	4.84(±2.27)	4.36(±0.27)	1.63(±0.08)	0.75(±0.25)	0.93(±0.26)	4.35(±0.68)
P-D.M.I.	-	10.0	66.3	84.6	80.9	10.2
Sc. Met.	322	322	345	232	234	295
Ab. met.	2	2	205	5	2	16
PAM	0.63	0.63	59.29	0.82	1.68	6.32
Type of observed Aberration	ctb, ctd	ctb, ctg	ctb, ctg, ctd, ace, cte	ctb, ctg, ctd	ctb	ctb, ctd, ace

สำหรับการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซม หรือ chromosome aberration เป็นการสังเกตและนับจากจำนวนเซลล์ 232-345 เมตาเฟส (metaphase) ในแต่ละกลุ่ม และได้แสดงผลไว้ในตารางที่ 4 จะเห็นว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจาก *A. reticulata*, *A. squamosa* และ *M. fruticosum* มีค่าร้อยละความผิดปกติของเมตาเฟส (percentage of aberrant metaphase ในที่นี้ใช้อักษรย่อเป็น PAM) ตามลำดับคือ 0.82, 1.68 และ 6.32 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเซลล์ที่ได้รับ DMSO และ กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีค่า PAM เป็น 0.96 และ 0.63 ตามลำดับ จากการสังเกตและบันทึกความผิดปกติของโครโมโซมทั้งในเชิงจำนวนและรูปร่างโครงสร้าง พบว่า แบบแผนการเปลี่ยนแปลงทางจำนวนโครโมโซมของเซลล์หลังจากได้รับสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งจะเห็นว่า เซลล์ที่มีโครโมโซม 67 แท่งเป็นกลุ่มที่มีร้อยละของความถี่สูงสุด เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม 68 แท่งมีจำนวนลดลงในกลุ่มที่ได้รับ DMSO และทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพืช มีความผิดปกติในเชิงโครงสร้างของโครโมโซมเกิดขึ้น ในทุกกลุ่มของเซลล์คือทั้งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพืชทุกชนิด กลุ่มที่เป็นกลุ่มควบคุมสารอาหารเลี้ยงเซลล์ และกลุ่มที่ได้รับ DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมตัวทำลาย โดยสามารถจำแนกความผิดปกติได้ 4 แบบ คือ acentric fragment (ace), chromatid break (ctb), chromatid deletion (ctd) และ chromatid gap (ctg) และได้แสดงตัวอย่างภาพถ่ายของลักษณะความผิดปกตินี้ในภาพที่ 3 จะเห็นว่าความผิดปกติสามแบบหลังเป็นในระดับโครมาทิด ส่วนแบบแรกเป็นระดับโครโมโซม เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจาก *A. reticulata* พบความผิดปกติทั้ง 4 แบบที่ได้กล่าวแล้ว ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับสารสกัด *A. squamosa* และ *M. fruticosum* พบเฉพาะ ctb และ ctb + ctd ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ได้รับ MMC มีความผิดปกติด้วยร้อยละที่สูงมาก คือ 59.29 โดยพบแบบที่เป็น chromosome break ซึ่งเรียก acentric fragment หรือ ace และแบบที่เป็น chromatid exchange หรือ cte

อภิปรายผลและข้อคิดเห็น

จากงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พยายามดำเนินงานเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่ได้ให้ไว้แก่ผู้สนับสนุนทุนซึ่งก็คือสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งสามารถแยกได้เป็นสองประเด็นใหญ่ คือ การทดสอบคัดเบื้องต้น หรือ screening หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านหอนนพยาธิ และต่อต้านเซลล์มะเร็ง และในขณะเดียวกันประเด็นที่สองก็เป็นการจัดตั้งและพัฒนาระบบการตรวจหาและทดสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีมาตรฐานขึ้นในห้องปฏิบัติการของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งทั้งสองประเด็นแม้ว่าจะมีความเกี่ยวข้องกันเนื่องจากเป็นการพิจารณาผลจากกระบวนการทดลองอันเดียวกันแต่ก็มีความแตกต่างในประเด็นหลักที่เกี่ยวข้องในเชิงวิชาการซึ่งเป็นหัวใจของการทดสอบคัดเบื้องต้นที่เน้นการตรวจหาและทดสอบฤทธิ์ของสาร และควรจะมีการค้นพบสารใหม่หรือปฏิกิริยาใหม่ที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (Wang and Huang, 2005) ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ที่เน้นเชิงวิชาการโดยใช้กระบวนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ในขณะที่การจัดตั้งและพัฒนาระบบการที่เหมาะสมในการคัดกรองและตรวจสอบ เพื่อให้การคัดกรองเบื้องต้นนั้นมีมาตรฐานเป็นกระบวนการเชิงกายภาพ ที่เน้นการแสวงหากระบวนการที่เหมาะสมกับสภาพในห้องปฏิบัติการ การจัดการภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งต้องมีการพัฒนาขึ้นมาโดยอาศัยเอกสารอ้างอิงและคำแนะนำช่วยเหลือจากผู้มีประสบการณ์ และนำมาปฏิบัติจริง ซึ่งก็ในบางครั้งก็ต้องเป็นการลองผิดลองถูก บางครั้งก็ล้มเหลว และกระบวนการที่ต้องใช้เทคโนโลยีระดับสูงก็ไม่เหมาะสมกับภาวะปัจจัยทางด้านงบประมาณ ดังนั้นในที่นี้จึงจะขออภิปรายทั้งสองประเด็นแยกกัน เพื่อให้ผู้สนใจในแต่ละประเด็นติดตามได้ตรงตามความต้องการ

ประเด็นเชิงวิชาการในการคัดกรองเบื้องต้น

ได้มีการสอดแทรกความคิดเห็นไปแล้วบางส่วนในบทที่ว่าด้วยผลงานวิจัยซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องให้ความกระจ่างและเพื่อให้เห็นแนวคิดที่ชัดเจน ในที่นี้เป็นกรเพิ่มเติมนแนวคิดที่มีความหลากหลายและกว้างขวางอันจะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในอนาคต งานวิจัยนี้ได้เน้นการนำพืชจากสองวงศ์คือ Annonaceae และ Rubiaceae มาทำการวิจัยทั้งนี้เพราะมีความต้องการเน้นพืชที่หาได้ง่ายโดยทั่วไป และมีประวัติการนำมาใช้งานในตำรายาสมุนไพรโบราณหรือสืบทอดในเอกสารวิชาการซึ่งใช้ในการสืบค้นจำนวนหนึ่ง (Wutthi-Dramawetch, 1977) ซึ่งหากได้ผลดีก็จะเป็นการประเมินความเป็นพิษหากชาวบ้านนำไปใช้งานในสภาพยาพื้นบ้านที่สกัดโดยตรงจากพืช อีกประการหนึ่ง พืชที่ถูกระบุว่า เป็นยากำจัดพยาธิ มักจะถูกระบุอย่างจำเพาะว่าเป็นพืชพื้นเมืองชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว หรือไม่ก็ชนิด ทั้งที่ในความเป็นจริงมีพืชที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มหรือ genus เดียวกันอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่ถูกกล่าวถึงเลย เช่น ผลอ่อนของน้อยหน่า *Annona squamosa* ได้ถูกระบุว่ากำจัดเหาบนหัวคนได้และถูกใช้มาตั้งแต่โบราณ แต่

ไม่มีการบันทึกว่าผลอ่อนของ *Annona* ชนิดอื่นออกฤทธิ์อย่างเดียวกันหรือดีกว่าหรือไม่ สาเหตุหนึ่งอาจเป็นเพราะน้อยหน้าเป็นพืชพื้นบ้านหาได้ง่ายทั่วไปจึงนิยมใช้กันเพราะหาง่าย แต่ชนิดอื่นอาจหายากกว่าจึงไม่นิยม อีกประการหนึ่งมีความเป็นไปได้มากกว่าการจัดจำแนกพืชในระบบที่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลักเช่นในปัจจุบันนี้ อาจมีพืชที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่พืชเหล่านี้กลับมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันจึงจัดอยู่ใน genus เดียวกัน ซึ่งมักจะพบในกลุ่มที่มีสมาชิกจำนวนมาก (Maxwell, 2001) ดังนั้นในการคัดกรองเบื้องต้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำพืชในวงศ์เดียวกันแต่ไม่ได้มีบันทึกการออกฤทธิ์ดังกล่าวมาใช้ด้วย นอกจากนี้ถึงแม้ว่าจะมีการวิจัยในพืชกลุ่ม *annonaceous plant* อย่างค่อนข้างกว้างขวางในหลาย ๆ ประเทศแถบร้อนที่มีพืชตระกูลนี้แพร่กระจายอยู่ และได้มีการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญไว้จำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชในกลุ่ม genus เดียวกับน้อยหน้า (Alali, et al., 1998) ซึ่งจะได้สรุปสาระสังเขปในลำดับต่อไป แต่ในบรรดางานวิจัยเหล่านั้นยังไม่มีแม้ชิ้นเดียวที่ได้กล่าวถึงหรือมีแนวคิดในสองเรื่องที่มีในงานวิจัยนี้ คือ (1) ไม่มีรายงานการสกัดทดสอบ และวิเคราะห์สารออกฤทธิ์จากผลอ่อนของน้อยหน้าหรือพืชในวงศ์นี้เลย ส่วนใหญ่มุ่งเน้นสารจากเมล็ดและใบ อีกประการหนึ่ง (2) ยังไม่มีการนำสารออกฤทธิ์จากพืชในกลุ่มนี้มาศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาเป็นยารักษาโรคหรือยาต้านมะเร็งอย่างจริงจัง แต่ส่วนใหญ่มุ่งเน้นการนำไปใช้เป็นยาฆ่าแมลง (Rupprecht, et al., 1990) ดังนั้นหากพิจารณาประเด็นอันเกี่ยวเนื่องจากการใช้เป็นยารักษาโรคหรือยาต้านมะเร็ง สามารถมุ่งประเด็นไปในเรื่องของยารักษาที่เป็นปัญหาหลักของภูมิภาคของโลกที่ยากจนและมีปัญหาการระบาดของโรคนั้น นั่นคือยาต้านมะเร็ง และอีกประเด็นหนึ่งคือความต้องการตัวยารักษาโรคมะเร็งที่สามารถใช้ทดแทนตัวยามีใช้กันอยู่ในปัจจุบันซึ่งมีเพียงไม่กี่ตัวยาที่จะได้กล่าวถึงรายละเอียดในลำดับต่อไป ในรายงานนี้ นอกจากนั้นจากการสืบค้นเอกสารพบว่า ในระยะหลังมีการนำสารออกฤทธิ์จากพืชในวงศ์ทั้งสองไปทดสอบเพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดซึ่งปรากฏว่าได้ผลดี แต่จากรายงานการทดสอบเซลล์มะเร็งเหล่านั้นแทบจะไม่มีมีการเปรียบเทียบการทดสอบกับเซลล์ปกติเลย (Tanamatayarat, 2000) เป็นเพียงการใช้มาตรฐานจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เช่น สถาบันสุขภาพแห่งชาติ ของประเทศอเมริกา (NIH, USA) หรือองค์การอนามัยโลก (WHO) ที่ตั้งค่ามาตรฐานของสารออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งในการคัดกรองเบื้องต้นว่า ควรมีค่าไม่เกิน 30 ug/ml (Suffness and Pezzuto, 1990) จึงจะถือว่ามีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาในระดับสูงเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป ซึ่งแนวคิดนี้ได้ทำให้เกิดตัวยารักษาเซลล์มะเร็งที่ให้ผลข้างเคียงเป็นส่วนน้อย (Erdelmeier et al., 1992; Hsu, 1998) โดยเฉพาะต่อเซลล์ปกติที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์มะเร็ง เช่นเซลล์ที่ในสภาพปกติมีการแบ่งตัวทดแทนให้แก่ร่างกายอยู่แล้ว ซึ่งเกิดขึ้นในเซลล์ร่างกายหลาย ๆ แบบ เช่นเซลล์กำเนิดเส้นผม เซลล์กำเนิดผิวหนัง เซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ หรือเซลล์สืบพันธุ์ เป็นต้น ทำให้ผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการบำบัดทางเคมี ได้รับผลข้างเคียง

จากยานั้นไปด้วย ดังนั้นหากสามารถมีกระบวนการในการตรวจสอบผลข้างเคียงเหล่านี้ในการคัดกรองเบื้องต้นแล้ว ก็จะเป็นการช่วยเสริมมาตรฐานของ NIH หรือ WHO ให้ดียิ่งขึ้น โดยที่จะช่วยคัดกรองเฉพาะสารออกฤทธิ์ที่ทำลายเซลล์มะเร็งแต่มีผลต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด ซึ่งในการวิจัยนี้ได้นำแนวคิดของค่าดัชนีความจำเพาะหรือการเลือกออกฤทธิ์ต่อเป้าหมาย ที่เรียกว่า selective index เข้ามาประยุกต์ใช้ ซึ่งพบว่าดัชนีนี้เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้ ทำให้สามารถประเมินคุณภาพและประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ในการคัดกรองเบื้องต้นได้เป็นอย่างดี ทั้งในการประเมินผลข้างเคียงของสารออกฤทธิ์ต่อหนอนพยาธิ และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้หากการวิจัยใดที่เป็นการคัดกรองเบื้องต้นและไม่มีการประเมินดัชนีความจำเพาะนี้ อาจทำให้ได้ผลเป็นสารพิษหรือยาพิษที่ยับยั้งเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในลักษณะเดียวกับสารหนู (arsenic) ซึ่งอาจไม่ตรงกับวัตถุประสงค์ของการวิจัยนั้นๆ ได้ และเป็นเรื่องที่น่าระมัดระวังอย่างยิ่ง แม้ที่จริงแล้วแนวความคิดในเรื่องดัชนีความจำเพาะหรือการเลือกออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายนี้ได้มีการเสนอมาก่อนหน้าในหลายๆโอกาสและล่าสุดนี้โดย Atindehou *et al.* (2004) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาและประยุกต์ใช้ เป็นการเปรียบเทียบอัตราส่วนของค่า IC_{50} ของสารสกัดสองค่า คือ IC_{50} ของเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตที่เป็นเป้าหมาย กับ IC_{50} ของเซลล์ปกติ ดังนั้นหากสารออกฤทธิ์ใด ๆ มีค่าความจำเพาะสูงคือเข้าทำลายเซลล์มะเร็งหรือสิ่งมีชีวิตเป้าหมายได้ดีกว่าเซลล์ปกติ จะมีค่าดัชนีความจำเพาะหรือการเลือกออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายน้อยกว่า 1 และยังมีค่าน้อยกว่า 1 มากเท่าใดก็จะยังมีแนวโน้มในทางเภสัชรักษาเท่านั้น และนั่นคือการเลือกเข้าทำลายของสารออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายต่าง ๆ กันนั่นเอง และเช่นเดียวกันเมื่อเป็นการเปรียบเทียบค่าอัตราส่วน IC_{50} ของเซลล์ที่แบ่งตัว (ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเซลล์มะเร็ง) กับเซลล์ที่ไม่แบ่งตัว ก็จะทำให้เห็นแนวโน้มของการออกฤทธิ์ข้างเคียงของการนำมาใช้ทางเภสัชรักษานั้นเอง

สำหรับการอภิปรายผลเชิงเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งหนอนพยาธิและเซลล์มะเร็งโดยการอ้างอิงงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์ก่อนหน้างานวิจัยนี้ได้เขียนไว้โดยละเอียดในการตีพิมพ์ผลงานที่เกี่ยวข้อง ซึ่งสามารถดูได้ในภาคผนวก และขอสรุปสาระสังเขปถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำคัญที่พบในพืชวงศ์น้อยหน่า และมักพบว่าเป็นตัวการทำหน้าที่ คือ อะซิโทจีนิน หรือ acetogenin ซึ่งเป็นสารที่พบในสารสกัดจากพืชใน genus *Annona* แทบทุกชนิด การศึกษาเกี่ยวกับเคมีวิทยาของพืช (phytochemistry) ในกลุ่มนี้มีกว้างขวางมาก และมีการรวบรวมข้อมูลไว้อย่างเป็นระบบโดยคณะผู้วิจัยภายใต้การนำของ ศาสตราจารย์ เจอร์รี แอล แมคลัฟฟิน (Professor Jerry L. McLaughlin) ในอเมริกาในปี 1990 ซึ่งมีการกล่าวถึงสารอัลคาลอยด์และนออัลคาลอยด์ (alkaloid and non-alkaloid) ที่เป็นสารออกฤทธิ์ตามธรรมชาติที่พบในพืชกลุ่มนี้จำนวนมาก (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 1996 และ Alali *et al.*, 1999) และมีการรวบรวมสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางเคมีเมื่อไม่นานมานี้โดย Kim and Park (2002) สารเหล่านี้ได้รับการศึกษาการออกฤทธิ์แบบต่างๆ

ได้แก่ ต่อด้านแบคทีเรีย (antibacterial) ต่อด้านปรสิต (antiparasitic) ต่อด้านตัวเบียน (pesticidal) ต่อด้านโรควาร์คินสัน (antiperkinsonian) และต่อด้านเนื้องอก (antitumor) แท้ที่จริงแล้ว อะซิโทจีนิน เป็นชื่อที่ใช้เรียกสารเคมีกลุ่มใหญ่ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 35-37 อะตอม และพบว่ามีบางงานวิจัยระบุว่ามิฤทธิ์ในการต่อต้านเนื้องอก และเป็นสารควบคุมตัวเบียนที่มีประสิทธิภาพสูงมาก (He *et al.*, 1997) การออกฤทธิ์ของอะซิโทจีนินนั้นมิกกลไกที่เข้าไปยับยั้งเอนไซม์ ubiquinone oxidoreductase ของ NADH ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Complex I ในไมโทคอนเดรีย จึงทำให้ระดับพลังงานของเซลล์ลดลงและมีส่วนในการทำให้เซลล์ตาย (Londerhausen *et al.*, 1991; Ahammadsahib *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1993 และ Morre *et al.*, 1995) มีรายงานว่าสารสกัดหยาบจาก *Annona senegalensis* มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียได้ (Ajaiyeoba *et al.*, 2006) มีการคาดหวังกันว่าสารอะซิโทจีนินเหล่านี้อาจเป็นสารเคมีออกฤทธิ์ตัวใหม่ในทางเคมีเภสัชอุตสาหกรรมที่จะมีการผลิตออกมาเป็นยาต่อต้านเนื้องอกและควบคุมตัวเบียนในอนาคตอันใกล้นี้ นอกจากนี้ Kamuhabwa *et al.* (2000) ได้รายงานการออกฤทธิ์ของสารที่สกัดได้ที่ต่อต้านเซลล์สายพันธุ์มะเร็งหลายชนิดอีกด้วย สารสกัดจากใบของ *A. muricata* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ด้วยค่า IC_{50} 1:9 ug/ml (Kim *et al.*, 1998) ซึ่งจะเห็นว่ามีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ต่อเซลล์สายพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้สารสกัดของพืชชนิดนี้จากส่วนต่างๆ คือ เมล็ด ลำต้น เปลือกต้น และส่วนเปอร์ริคาร์ป (pericarp) แสดงฤทธิ์ต่อต้านปรสิตหลายชนิด ได้แก่ *E. histolytica*, *N. brasiliensis*, *M. dessetae*, *A. salina* และ *Leishmania* หลายสปีชีส์ (Bories *et al.*, 1991; Jaramillo *et al.*, 2000 และ Wang *et al.*, 2002) สารสกัดจาก *A. reticulata* และ *A. squamosa* ในงานวิจัยนี้แสดงฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง โดยมีค่าความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเซลล์ปกติมาก ซึ่งความสำคัญนี้ยังไม่มีการกล่าวถึงมาก่อนในผลงานตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ที่ได้อ้างถึงไปแล้ว

มีรายงานว่า asimicin ซึ่งเป็นสารอะซิโทจีนินตัวหนึ่งที่สกัดมาจากพืช *Asimina triloba* สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* ที่ IC_{50} เพียง 0.1 ug/ml (Johnson *et al.*, 1996) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงการออกฤทธิ์สูงยิ่ง ซึ่งต่างจากค่าสารสกัดที่ได้จากการทดลองนี้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าหากสารออกฤทธิ์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นก็จะสามารถออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น (McLaughlin *et al.*, 1997 และ Mitchell, 2000) เพียงแต่ในการทดลองนี้ไม่ทราบว่าสารออกฤทธิ์ที่แท้จริงคือสารอะซิโทจีนินตัวใด เนื่องจากแท้ที่จริงแล้วมีสารอะซิโทจีนินที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้วมากกว่า 300 ตัวและมีหลายตัวที่มีการศึกษาทางด้านพิษวิทยาแล้ว (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 1996; Zafra-Polo *et al.*, 1998; Yazbak *et al.*, 1998 and Chang *et al.*, 1999) หรือการออกฤทธิ์นี้อาจเป็นจากสารอื่นที่ไม่ใช่สารอะซิโทจีนินหรือไม่ เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการสกัดจากผลอ่อนของพืชในกลุ่มนี้เลย ซึ่งคงต้องมีการพิสูจน์กันต่อไป อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีสารอะซิโทจีนินมากกว่า 40

ชนิดที่แตกต่างกันอยู่ร่วมกันหรือถูกสกัดออกมาด้วยกันในคราวเดียวจากพืชเพียงชนิดเดียว และในการออกฤทธิ์นั้นก็อาจมีการเสริมฤทธิ์กันหรือยับยั้งฤทธิ์กันได้ (Raffauf et al., 1978 และ Alali et al., 1999) จากงานวิจัยนี้ปรากฏว่าสารสกัดจาก *A. muricata* และ *A. siamensis* ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหนอนทั้งสองชนิด สำหรับฤทธิ์ในการต่อต้านหอยมอลลัส (molluscicide) นั้นมีรายงานการทดสอบสารสกัดจาก *A. squamosa* (Singh and Singh, 2004) และจาก *A. muricata* (dos Santos and Sant'Ana, 2001) ซึ่งมี IC_{50} ในช่วงประมาณ 0.97-20.26 ppm ซึ่งถือว่ามีความการออกฤทธิ์ที่สูง สำหรับการทดสอบสารสกัดจากพืชสองชนิดคือ *A. squamosa* และ *A. muricata* ซึ่งพบว่าการออกฤทธิ์ในเชิงต่อต้านหอยมอลลัสนั้นแทบไม่มีเลยกล่าวคือมีค่า IC_{50} มากกว่า 5,000 ug/ml และส่งผลต่อการเดินของหัวใจของหอยไม่มากนักแม้ว่าจะมีการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับ IC_{100} สำหรับ cercaria ก็ตามและหอยสามารถกลับมามีชีวิตการเดินของหัวใจที่ปกติได้เมื่อไม่มีสารสกัด นี้อยมแสดงให้เห็นว่าหากต้องการกำจัด cercaria ในระยะติดตัวของพยาธิใบไม้เลือดในธรรมชาติโดยใช้สารสกัดให้ได้ทั้งหมด (100%) ก็จะมีการรบกวนหอยพาหะน้อยมาก ซึ่งก็แทบจะไม่ใช่เป็นการรบกวนสายโซ่อาหาร (food chain) หรือระบบนิเวศที่มีหอยเข้าไปเกี่ยวข้องด้วยเลย แต่อย่างไรก็ตามต้องไม่ลืมว่าการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านพยาธิใบไม้ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการเจริญและอายุของพยาธิใบไม้ด้วย (Sabah et al., 1986)

สำหรับพืชในวงศ์ Rubiaceae มีรายงานถึงความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต่อต้านเนื้องอกจากสารสกัดจากบางสปีชีส์ สารสกัดจากดอกของ *Ixora javanica* แสดงฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งสองแบบคือ Dalton's lymphoma (DLA) และ Ehrlich Ascites tumor cells โดยมีค่า IC_{50} ที่ 12 และ 65 ug/ml ตามลำดับ (Nair and Panikkar, 1990) โดยที่สารสกัดนี้ไม่มีผลต่อ lymphocyte ปกติ ซึ่งความจำเพาะในการเลือกกำจัดเซลล์มะเร็งโดยไม่ทำอันตรายให้กับเซลล์ปกตินี้เป็นลักษณะที่ดีของสารออกฤทธิ์ที่มีแนวโน้มว่าจะนำมาใช้ในเชิงเภสัชรักษาได้ ไม่ใช่เป็นเพียงยาพิษที่ทำลายเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตทุกแบบ (Roth et al., 1986 และ Nair et al., 1991) ซึ่งสารสกัดจาก *I. lobbii* ในงานวิจัยนี้ก็ยังมีลักษณะนี้เช่นเดียวกันคือมีการเลือกออกฤทธิ์ต่อหนอน *C. elegans* ด้วยค่า IC_{50} ที่ดีมาก คือ 11.0 แต่ไม่ออกฤทธิ์ต่อ cercaria และออกฤทธิ์ในระดับน้อยมากต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบและไม่ออกฤทธิ์เลยต่อเซลล์ปกติ แต่เป็นที่น่าประหลาดใจว่าสารสกัดจาก *I. ebarbata* ในงานวิจัยนี้ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อทั้งเซลล์และหนอนเลย นอกจากนี้มีรายงานการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบของ *Ixora coccinea* ในลักษณะ antinociception (Ratnasooriya et al., 2005) ซึ่งน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งแต่อยู่นอกเหนือขอบเขตของการวิจัยนี้ สำหรับ *P. foetida* มีรายงานว่ามียฤทธิ์ในการต้านทานอาการท้องร่วง (antidiarrhoea) และแก้อาการอักเสบ (anti-inflammatory) (Afroz et al., 2006 และ De et al., 1994) แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียหรือเชื้อรา (Pedersen et al., 1999 และ Cavin et al., 1999) สารสกัดจาก *Paederia scandans* ที่แสดงฤทธิ์ต่อต้านเชื้อไวรัส EBV (Kapadia et al., 1996) ซึ่งทั้งหมดนี้

ต้องใช้สัตว์ทดลองในการศึกษาซึ่งควรจะเป็นการศึกษาในระดับลึกและไม่ใช้การคัดกรองเบื้องต้น ซึ่งอยู่นอกเหนือขอบเขตของงานวิจัยนี้

สำหรับการทดสอบด้านพันธุพิษโดยสารสกัดจากพืชสามชนิดคือ *A. reticulata* (ผลอ่อน) *A. squamosa* (ผลอ่อน) และ *M. fruticosum* (ใบ) ได้แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มของความจำเพาะต่อเซลล์สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งสอง คือ HeLa และ AMC-K46 เท่าที่ทราบจากการสืบค้นงานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ได้ทำการสกัดสารจากผลอ่อนของพืชทั้งสองชนิดและปรากฏว่าสารสกัดจากผลอ่อนของพืชทั้งสองนี้ได้แสดงการออกฤทธิ์ทางพันธุพิษที่ดีและชัดเจนมากซึ่งได้ให้ความเห็นไปแล้วในส่วนของผลการวิจัย ในที่นี้จะเพิ่มเติมอีกเล็กน้อยเมื่อพิจารณาจากค่า P-D.M.I. เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจาก *A. reticulata* และ *A. squamosa* ซึ่งสูงกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม แต่พบว่ามีค่าร้อยละของความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งอาจเนื่องมาจากความไม่เสถียรทางพันธุกรรมอันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่างของเซลล์ AMC-K46 (Walen, 2002) ความผิดปกติที่เกิดในระดับโครมาติดในเซลล์แทบทุกกลุ่มคงจะเป็นเนื่องจากผลของสารสกัดต่อเซลล์ที่อยู่ในระยะ M phase ของวัฏจักรของเซลล์ (Mitchell, 2000) มีการศึกษาชนิดของสารออกฤทธิ์ โครงสร้างทางเคมี กลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ และให้ความเห็นอย่างกว้างขวางถึงแนวโน้มการนำมาใช้เป็นตัวยาสำคัญในอนาคต ซึ่งผู้สนใจสามารถติดตามหาอ่านได้ (Leboeuf *et al.*, 1982; Chang, 1993; Wu *et al.*, 1996; Woo *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998; and Alali *et al.*, 1998)

ยังไม่พบรายงานที่ใช้เซลล์น้ำคร่ำของคนในการทดสอบคัดเบื้องต้นเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช หรือแม้กระทั่งการศึกษาทางเซลล์พิษวิทยา (cytotoxicology) หรือพันธุพิษวิทยา โดยปกติแล้วการศึกษาจะใช้เซลล์จากไขกระดูกของสัตว์ทดลอง และใช้เทคนิคที่นิยมทำมากคือ micronucleus assay (Hu *et al.*, 2005 และ Çelik *et al.*, 2005) มีบ้างเช่นกันที่ศึกษาในเซลล์ 3T3 ซึ่งเป็นเซลล์เชื้อสายจากไฟโบรบลาสต์ของหนูทดลอง (Chew and Maibach, 2000) ในที่นี้ AMC-K46 ตอบสนองต่อสารทดสอบมาตรฐานคือ SDS ด้วยค่า IC_{50} ที่ 71.3 ug/ml ซึ่งใกล้เคียงมากกับการตอบสนองของ 3T3 ที่ 70 ug/ml นี้ย่อมแสดงให้เห็นว่า การใช้เซลล์ AMC-K46 หรือเซลล์จากน้ำคร่ำอื่นอาจให้ผลดีในการคัดกรองเบื้องต้น และที่สำคัญคือเป็นเซลล์ของคน ที่ยอมให้ผลที่สามารถคาดหมายได้ดีกว่าในการนำผลไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคในผู้ป่วย

อีกประเด็นหนึ่งของเซลล์ AMC-K46 ที่สำคัญคือลักษณะการเป็นเซลล์เชื้อสายที่เกิดจาก spontaneous mutation ซึ่งได้มีการกล่าวถึงมาก่อนหน้านี้แล้วจากผลงานของ Walen (2002) ลักษณะเช่นนี้มีความสำคัญมากในการนำเซลล์มาใช้ในการทดสอบทางเซลล์พิษวิทยา เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการมาก่อน (transformation) นั่นคืออย่างน้อยก็ไม่มีปฏิกิริยาปนเปื้อนจากพันธุกรรมของเซลล์สายพันธุ์อื่น

หรือจากพันธุกรรมของไวรัส และเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดภายในเซลล์เองเท่านั้น ซึ่งลักษณะต่างๆของเซลล์สายพันธุ์นี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตอบสนองทางยาน่าจะมีลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์ปกติมากกว่าเซลล์แปลงสายพันธุ์ (transformed cells) อื่นๆและหรือเซลล์มะเร็ง ในการทดลองนี้ได้พยายามใช้เซลล์ AMC-K46 ในระยะหรือรุ่นแรกๆ (early passage) จึงทำให้มีความมั่นใจได้ว่ามีความใกล้เคียงกับเซลล์ปกติมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการมีจำนวนโครโมโซมในลักษณะ aneuploidy ตามที่ได้แสดงในผลการวิจัยนั้น ถือว่าเป็นลักษณะสำคัญของเซลล์ที่ผ่าน spontaneous mutation มาได้ (Freshney, 2000) และกลับเป็นผลดีในการนำเซลล์นี้มาทดสอบทางพันธุพิษวิทยา เนื่องจากสภาวะความถี่กิจกรรมของโครโมโซมมากกว่าปกติ ซึ่งจะทำให้ความผิดปกติอันเกิดขึ้นเนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อโครโมโซมหรือโครมาติดมีความเด่นชัดมากขึ้นกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งจะเห็นได้ชัดจากการตอบสนองของเซลล์นี้ต่อ MMC ซึ่งเป็นตัวยาสำคัญในการบำบัดควบคุมเซลล์มะเร็งในการรักษาโดยทั่วไปอยู่แล้ว ในการทดลองนี้จะเห็นว่าการตอบสนองของ AMC-K46 ต่อ MMC ด้วยค่าร้อยละของเซลล์ที่มีความผิดปกติของโครโมโซม (PAM) สูงมากถึง 59.29 นั้นย่อมแสดงถึงความเสี่ยงและผลข้างเคียงในการใช้ยานี้ในการรักษาโดยทั่วไป ในขณะที่เซลล์แสดงการตอบสนองต่อสารสกัดจากพืชทั้งสามชนิดอย่างแทบจะไม่มีผลด้วยค่า PAM ต่ำมากและใกล้เคียงกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม นอกจากนี้แบบของความผิดปกติของทั้งโครโมโซมและโครมาติดที่เกิดจากพืชทั้งสามชนิดต่อเซลล์ AMC-K46 ยังมีน้อยกว่าที่พบในเซลล์ที่ได้รับ MMC อีกด้วยซึ่งเท่ากับเป็นการเน้นย้ำให้เห็นถึงความมีศักยภาพและประสิทธิภาพของสารสกัดในการกำจัดเซลล์มะเร็งโดยมีผลข้างเคียงน้อยที่สุดต่อเซลล์ปกติ อย่างไรก็ตามลักษณะ aneuploidy เป็นลักษณะหนึ่งที่สำคัญของเซลล์มะเร็ง และในกรณีของเซลล์ AMC-K46 ที่พบจำนวนโครโมโซมสูงถึง 136 แท่งใน 1 เมทาเฟส เป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง และควรมีการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ AMC-K46 ในด้านนี้อย่างลึกซึ้งจริงจัง ซึ่งถึงแม้ว่าจะเป็นการเน้นการศึกษาพื้นฐานทางพันธุศาสตร์ แต่ก็อาจให้ผลที่คุ้มค่าในทางปฏิบัติเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบคัดเบื้องต้นที่ต้องการเซลล์เชื้อสายหลากหลายแบบในการคัดกรอง เพื่อให้สามารถแยกแยะความจำเพาะและผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ก่อนการศึกษาระดับสูงต่อไป อีกประการหนึ่งการนำเซลล์สายพันธุ์ของคนมาใช้ในการคัดกรองเพื่อศึกษาทางพันธุพิษวิทยาเป็นการลดความผันแปรของความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของโครโมโซมอันมีอิทธิพลมาจากอายุและเพศของสิ่งมีชีวิต (Hedner *et al.*, 2004) และเป็นความสะดวกอีกประการหนึ่งที่ในการทดสอบคัดเบื้องต้นซึ่งเป็นการทดสอบที่มีปัจจัยทางด้านความเข้มข้นของสาร หรือที่เรียกว่า dose-dependent assay เข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการเกิด chromatid gap ซึ่งถือเป็นตัวชี้วัดพันธุพิษที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ (Brogger, 1982) ซึ่งเทคนิคที่ใช้การย้อมสี Geimsa แบบที่มีการประยุกต์ตามวิธีการของ Klangsinrikul (2003) นั้นพบว่าให้ผลดี ทำให้สามารถเห็นและจำแนกความผิดปกติต่างๆของทั้งโครโมโซมและโครมา

ติดได้ชัดเจน ซึ่งแท้ที่จริงแล้วการศึกษา ความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) การแลกเปลี่ยนโครมาติด (chromatid exchange) และการนับและประเมิน MI และ P-D.M.I. ตามที่ได้กล่าวแล้วข้างต้นนี้ เป็นการศึกษา แบบ cytogenetical endpoints นั่นคือเป็นการดูผลทางพันธุพิษเมื่อกระบวนการหรือกลไกการเกิดพิษได้ดำเนินมาถึงช่วงหนึ่งแล้ว (Major *et al.*, 1994) ไม่ว่าจะเป็ยพิษเฉียบพลันหรือพิษเรื้อรัง ซึ่งเสริมกระบวนการในการคัดกรองเบื้องต้น เป็นอย่างดี ดังนั้นการศึกษาหลังจากนี้ควรเป็นการศึกษาถึงผลของการได้รับสารพิษนั้นในระยะยาวต่อเซลล์ไม่ว่าจะยังคงได้รับสารพิษนั้นอยู่หรือไม่ก็ตาม ซึ่งก็จะเป็นเรื่องของวางแผนการวิจัยเพื่อให้เห็นภาพที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์ของคนเป็นโมเดลในการศึกษาทางพันธุพิษนี้มีปัจจัยอันเกี่ยวเนื่องจากระยะของเซลล์ในวัฏจักร cell cycle ซึ่งจะพิจารณาได้จาก average generation time เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย (Henderson *et al.*, 1997) ซึ่งปัจจัยนี้ไม่ได้นำเข้ามาพิจารณาในการคัดกรองเบื้องต้นในการทดลองนี้ นอกจากนี้การศึกษาระดับสูงทางพันธุพิษควรพิจารณาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงและเชื่อถือทาง qualitative gene profiling ได้เข้าร่วมด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาทางเภสัชพันธุกรรม หรือ pharmacogenomics (Schweighoffer *et al.*, 2000) หากพิจารณาการเกิด spontaneous mutation ในระดับ population ในระบบนิเวศนั้น เป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิดเพราะเป็นกลไกสำคัญประการหนึ่งของ adaptation (Hall, 1988) แต่ในกรณีของเซลล์ AMC-K46 นี้ นับเป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นได้น้อยมากในประชากรของคน และอาจส่งผลกระทบต่อความผิดปกติที่ปรากฏทางสรีรภาพได้ (Drake *et al.*, 1998) ดังนั้นการศึกษาลักษณะและแบบแผนของจำนวนโครโมโซมโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยาจึงเป็นเรื่องที่สำคัญอย่างยิ่ง (Wurgler and Kumer, 1992) ซึ่งควรมีการวิจัยอย่างจริงจังในกลุ่มประชากรของคนไทยในอนาคต

จากผลการวิจัยทั้งหมดนี้จะเห็นว่า การคัดกรองเบื้องต้นเพื่อค้นหัตัวยาหรือสารออกฤทธิ์ใหม่นั้นเป็นเรื่องที่จะสามารถทำได้ไม่ยากนัก หากมีกระบวนการและวิธีการที่เหมาะสมกับทั้งใช้เวลาและงบประมาณไม่มาก แต่ต้องไม่ลืมและขอย้ำว่า นี่เป็นการคัดกรองเบื้องต้น ดังนั้นขั้นตอนนอกเหนือจากนี้ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับการทำให้สารบริสุทธิ์และการศึกษาโครงสร้างทางเคมี และการนำกลับมาทดสอบกับหนอนและเซลล์ที่เหมาะสมนั้นเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลาและงบประมาณเพิ่มเติม ซึ่งจะได้นำข้อคิดเห็นและแนวคิดนี้เข้าหารือและนำเสนอแก่ผู้บริหารของแหล่งทุนที่เหมาะสมต่อไป อย่างไรก็ตามผู้วิจัยขอเรียนเน้นในที่นี้ว่า ได้มีการวิจัยอย่างกว้างขวางในพิชวงค์อื่นๆที่ไม่ได้ระบุในวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้และพบแนวโน้มที่น่าสนใจจากพิษพื้นเมืองจำนวนหนึ่งซึ่งต้องการเวลาและความร่วมมือในการวิจัยจากผู้เชี่ยวชาญทั้งทางด้านเคมี เซลล์ชีววิทยา พิษวิทยา และเภสัชวิทยา ซึ่งในขณะนี้กำลังดำเนินการอยู่ ย้อนกลับมาพิจารณาพิษที่ได้ทำการวิจัยไปแล้วที่น่าสนใจ

คือผลอ่อนของ *A. squamosa* และ *A. reticulata* เนื่องจากเป็นส่วนของพืชที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามี การนำไปวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ จึงยังไม่ทราบว่าแท้ที่จริงแล้วเป็นสารที่มี แนวน้ำมันที่ตีตัวใหม่หรือไม่ ซึ่งก็เป็นประเด็นที่น่าจะเปิดทำการวิจัยในระดับบัณฑิตศึกษาได้ และ เช่นเดียวกับพืชในวงศ์ Rubiaceae อีก 2 ชนิด คือ *I. lobbia* และ *P. foetida* ซึ่งให้แนวน้ำมันที่ดี ในการยับยั้งหนอนตัวกลมและไม่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ ซึ่งผู้วิจัยมีแผนการทำวิจัยในระดับสูงต่อไป ในอนาคต อย่างไรก็ตามผู้วิจัยใคร่ขอแสดงความคิดเห็นในท้ายที่สุดนี้ว่า ประเทศไทยของเรา น่าจะมีแผนในการผลิตยาในระดับอุตสาหกรรมที่ประกอบด้วยตัวยาหายากที่ค้นพบในประเทศ โดยมีเป้าหมายในการจำหน่ายไปในประเทศโลกที่สามที่ยังขาดแคลน เช่นในแอฟริกา รวมทั้ง เพื่อนบ้านอินโดจีน ประเทศไทยมีศักยภาพอีกมาก แต่ยังขาดนโยบายในระดับรัฐบาล และการ ดำเนินงานจากผู้เชี่ยวชาญในหลาย ๆ สาขาที่ได้ผลและแข่งขันหรือร่วมมือกับต่างชาติได้

ประเด็นการจัดตั้งและพัฒนาระบบการที่เหมาะสมในการคัดกรองและตรวจสอบ

ได้มีการให้ความเห็นในประเด็นนี้ไปแล้วเป็นส่วนใหญ่ซึ่งกระจายอยู่ในส่วนที่เกี่ยวข้อง ทั้งในบทที่ว่าด้วยอุปกรณ์และวิธีการ และผลการทดลอง ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจใน ท้ายที่สุดนี้จะขอรวบรวมสาระสังเขปว่า จากวัตถุประสงค์ในการจัดตั้งและพัฒนาระบบการ ตรวจสอบและทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านหนอนพยาธิขึ้น ในห้องปฏิบัติการ ของคณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นั้น บัดนี้ได้มีระบบดังกล่าวนี้เกิดขึ้นและสามารถทำการคัด กรองเบื้องต้นเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชที่มีผลต่อต้านหนอนพยาธิของคน โดยใช้ หนอนตัวกลมหรือ nematode ที่มีชีวิตอิสระคือ *Caenorhabditis elegans* เป็นโมเดลของหนอน ตัวกลมที่เป็นปรสิต เนื่องจากหนอนชนิดนี้สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ง่าย ประหยัด และมีปัญหาน้อยมากในการดูแล เนื่องจากไม่ต้องมีพาหะกึ่งกลางที่ต้องเลี้ยงให้ได้ครบวงจรชีวิตใน ห้องปฏิบัติการ ซึ่งปัจจัยนี้มีความสำคัญมากเนื่องจากการคัดกรองเบื้องต้นต้องใช้หนอน จำนวนมากในเวลาเดียวกัน ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ การควบคุมปัจจัยทางสรีรภาพ ของหนอน ซึ่งควรสามารถควบคุมได้และหรืออย่างน้อยควรทราบภาวะปัจจัยเหล่านั้น ซึ่งจะมี ผลโดยตรงต่อการออกฤทธิ์ของสาร เนื่องจากการออกฤทธิ์ในบางกรณี ขึ้นอยู่กับเพศ อายุ หรือ ภูมิคุ้มกันหรือการต่อต้านยาของหนอนเอง สำหรับหนอนชนิดอื่นที่มีเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เฉพาะทางอยู่แล้วดังเช่นหนอนพยาธิใบไม้เลือดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ น่าจะเป็นการทำความร่วมมือ ในการใช้ทรัพยากรร่วมกัน ซึ่งจะเป็นผลดีกับทุกฝ่าย รวมทั้งประหยัดงบประมาณของชาติ และ ยังเป็นการส่งเสริมให้มีความร่วมมือระหว่างหน่วยงานที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทางอีกด้วย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้มีแผนการวิจัยที่จะใช้หนอนพยาธิที่อาศัยในทางเดินอาหารของคนและ สัตว์เลี้ยงมาใช้ในงานวิจัยให้มากขึ้นโดยอาจนำมาจากแหล่งที่เป็นไปได้คือ โรงฆ่าสัตว์เพื่อ บริโภคของเทศบาล ซึ่งได้จัดทำโครงการวิจัยในระดับบัณฑิตศึกษาขึ้นมาอีกโครงการหนึ่งซึ่ง ผู้สนใจสามารถดูรายละเอียดได้ในภาคผนวก

เพื่อให้เห็นภาพชัดขึ้นว่าห้องปฏิบัติการในการคัดกรองเบื้องต้นมีความสำคัญต่อประเทศไทย ขอย้อนกลับดูข้อมูลที่น่าสนใจบางประการว่า ประเทศของเรามีความอุดมสมบูรณ์ทางด้านความหลากหลายของทั้งพืชและสัตว์ซึ่งเป็นที่ประจักษ์แก่ทุกคนโดยไม่ต้องอ้างอิงเอกสารใดในที่นี้ ความหลากหลายนี้ส่งผลเป็นคุณต่อการนำพืชวัตถุมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหาร และยารักษาโรค ทำให้เกิดผลผลิตทางยามากมายจากพืชเหล่านั้น ความหลากหลายของวัสดุทางชีวภาพเหล่านี้ของประเทศมีมานานและถูกใช้อย่างกว้างขวางในอดีต แต่มีการจัดบันทึกและทำวิจัยศักยภาพเหล่านี้ให้เกิดประโยชน์น้อยมาก และเพิ่งจะเริ่มมีการวิจัยอย่างจริงจังเมื่อไม่นานมานี้เอง ปัจจุบันนี้มากกว่าครึ่งหนึ่งของตัวยาบรรดามีที่ใช้ทั่วโลกมาจากการดัดแปลงหรือใช้โดยตรงจากแหล่งธรรมชาติ (Reid *et al.* 1993) และเคยมีการประมาณว่า ประมาณ 47 ตัวยาในตลาดโลก เกิดจากการนำเอาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช tropical forest plants 39 ชนิดมาดัดแปลงเป็นตัวยา (Farnworth, 1988) ซึ่งจะเห็นได้ชัดว่าประเทศของเรายังคงมีอนาคตที่ดีมาก ๆ ในเรื่องนี้ หากมีการวิจัยอย่างจริงจัง

สำหรับการคัดกรองเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์นั้นเป็นการนำหลักการของ cell-based assay technology มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้โดยทำให้เกิดผลที่สำคัญ 3 ประการคือ ประการแรก เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งที่ใช้กันแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งก็สามารถทำให้เห็นว่ามีสารสกัดจากพืชบางชนิดที่แสดงแนวโน้มที่ดีในการกำจัดควบคุมเซลล์มะเร็ง และในขณะเดียวกัน ก็สามารถแสดงให้เห็นว่าสารสกัดนั้นมีผลน้อยมากต่อเซลล์ปกติ ซึ่งถือเป็นผลสำเร็จประการที่สองในงานวิจัยนี้ สำหรับผลประการที่สามซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการนำเซลล์มาใช้ในงานวิจัยนี้ด้วยก็คือ สามารถทำให้เห็นภาพว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดหอนพยาธินั้นไม่ใช่เป็นการออกฤทธิ์ในลักษณะยาพิษทั่วไปที่กำจัดสิ่งมีชีวิตทุกชนิดไปด้วย แต่เป็นการออกฤทธิ์แบบจำเพาะหรือเลือกออกฤทธิ์ทางเภสัชรักษาต่อเป้าหมายที่สนใจ ซึ่งจะเห็นว่าระเบียบวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ทำให้มีความชัดเจนในการคัดกรองเบื้องต้นเพื่อตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นขั้นตอนที่จะนำมาใช้งานในระยะต่อไปของการทำงานวิจัยในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเซลล์มนุษย์และสัตว์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบผลทางด้าน พันธุพิษวิทยานั้นยังอาจต้องมีการปรับปรุงเพื่อนำไปใช้งานต่อเซลล์ปกติเพื่อชี้ให้เห็นแนวโน้มของความปลอดภัยต่อการนำสารออกฤทธิ์ไปใช้ในการรักษาทุกระดับ ทั้งนี้ด้วยแนวความคิดว่า หากประชาชนหรือชาวบ้านนำพืชเหล่านี้ไปใช้ในการรักษาหรือประกอบอาหารนั้นควรมีข้อจำกัดหรือระมัดระวังอย่างไรบ้าง ถึงแม้ว่าการออกฤทธิ์ของสารสกัดอาจไม่ใช่การออกฤทธิ์เฉียบพลันที่ทำให้ถึงชีวิตในทันที แต่ก็อาจส่งผลถึงสารพันธุกรรม ซึ่งในบางกรณีอาจใช้เวลานานและส่งผลอย่างร้ายแรงต่อผู้ป่วยในภายหลังได้

เอกสารอ้างอิง

- วิทย์ เทียงบุรณธรรม, 2542. พจนานุกรมสมุนไพรไทย, พิมพ์ครั้งที่ 5, บริษัทรวมสาสน์ (1997) จำกัด, กรุงเทพฯ. 618 หน้า.
- ฝ่ายควบคุมโรคติดต่อทั่วไป. 2543. สรุปผลการดำเนินงานควบคุมโรคติดต่อทั่วไป, กลุ่มงานส่งเสริมและบริการวิชาการ, สำนักงานสาธารณสุขเชียงใหม่. 86 หน้า
- Afroz, S.; Alamgir, M.; Khan, M.T.H.; Jabbar, S.; Nahar, N.; and Choudhuri, M.S.K. 2006. Antidiarrhoeal activity of the ethanol extract of *Paederia foetida* Linn. (Rubiaceae). *Journal of Ethanopharmacology*, 105: 125-130.
- Ajaiyeoba, E.; Falade, M.; Ogbale, O.; Okpako, L.; and Akinboye, D. 2006. *In vivo* antimalarial and cytotoxic properties of *Annona senegalensis* extract. *African Journal, Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 3(1): 137-141.
- Ahammadsahib, K.I.; Hollingworth, R.M.; McGovern, J.P.; Hui, Y.H.; and McLaughlin, J.L. 1993. Inhibition of NADH:ubiquinone reductase (mitochondrial complex I) by bullatacin, a potent antitumor and pesticidal Annonaceous acetogenin. *Life Science*, 53: 1113-1120.
- Alali, F.Q.; Kaakeh, W.; Bennett, G.W.; and McLaughlin, J.L. 1998. Annonaceous acetogenins as natural pesticides: potent toxicity against insecticide-susceptible and resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 91: 641-649.
- Alali, F.Q.; Liu, X.; and Mclaughlin, J.L. 1999. Annunaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*, 62(3): 504-540.
- Atindehou, K.K.; Schmid, C.; Burn, R.; Kone, M.W.; and Traore, D. 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Cote d' Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 221-227.
- Balbaa, M.; and Bassiouny, K. 2006. *In vitro* effect of schistosomicidal drugs on hepatic arylsulfatase B from the schistosoma-infected mouse. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21(1): 81-85.
- Blas, B.L.; Lipayon, I.L.; Tormis, L.C.; Portillo, L.A.; Hayashi, M.; and Matsuda, H. 2006. An attempt to study the economic loss arising from *Schistosoma japonicum* infection and the benefits derived from treatment. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 3(1): 26-32.

- Bories, C.; Loiseau, P.; Cortes, D.; Myint, S.H.; Hocquemiller, R.; Gayral, P.; Cave, A.; and Laurens, A.. 1991. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. *Planta Medica*, **57(5)**: 434-436.
- Brogger, A. 1982. The chromatid gap – a useful parameter in genotoxicology? *Cytogenetics and Cell Genetics*, **33(1-2)**: 14-19.
- Cavin, A.; Dyatmyko, W.; and Hostettmann, K. 1999. Screening of Indonesian plants for antifungal and free radical scavenging activities. *Pharmaceutical Biology*, **37(4)**: 260-268.
- Çelik, A.; Mazmanlı, B.; Çamlıca, Y.; Çömelekoğlu, Ü; and Aşkin, A. 2005. Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow by gavage administration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **61**: 128-133.
- Chang, F.R.; Chen, J.L.; Chiu, H.F.; Wu, M.J.; and Wu, Y.C. 1998. Acetogenin from seeds of *Annona reticulata*. *Phytochemistry*, **47**: 1057-1061.
- Chang, F.R.; Chen, J.L.; Lin, C.; Chiu, H.F.; Wu, M.J.; and Wu, Y.C. 1999. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. *Phytochemistry*, **51**: 883-889.
- Chang F.R.; Wu Y.C.; Duch C.Y.; and Wang S.K. 1993. Studies on the acetogenins of Formosan annonaceous plants. II. cytotoxic acetogenins from *Annona reticulata*. *Journal of Natural Product*, **56**: 1688-1694.
- Chapuis, C.J.; Sordat, B.; and Hostettmann, K. 1988. Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **23(2-3)**: 273-284.
- Chaichantiyuth, C.; Tiayworanan, S.; Mekaroonreung, S.; Ngamrojnavanich, N.; Roengsumran, S.; Puthong, S.; Petsom, A.; and Ishikawa, T. 2001. Oxidized heptenes from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry*, **58(8)**: 1311-1315.
- Dasa, K. 2005. *Effects of crude extracts of some medicinal plants in family Annonaceae on HeLa cells and human amniotic fluid cell lines*. MSc Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- De, S.; Ravishankar, B.; and Bhavsar, G.C. 1994. Investigation of the anti inflammatory effects of *Paederia foetida*. *Journal of Ethnopharmacology*, **43**: 31-38.
- Doenhoff, M.J.; Kimani, G; and Cioli, D. 2000. Praziquantel and control of Schistosomiasis. *Parasitology Today*, **16(9)**: 364-366.
- Doenhoff, M.J.; Kusel, J.R.; Coles, G.C.; and Cioli, D. 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96(5)**: 465-469.

- Doenhoff, M.J.; and Pica-Mattocchia, L. 2006. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert Review of Anti- Infective Therapy*, **4(2)**:199-210.
- dos Santos, A.F.; and Sant'Ana, A.E.G. 2001. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine*, **8(2)**: 115-120.
- Drake, J.W.; Charlesworth, B.; Charlesworth, D. and Crow, J.F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, **148**: 1667-1686.
- Erdelmeier, A.C.; Regenass, U.; Rali, T.; and Sticher, O. 1992. Indole alkaloids with *in vitro* antiproliferative activity from the ammoniacal extract of *Nauclea orientalis*. *Planta Medica*, **58(1)**: 43-48.
- Fallon, P.G.; and Doenhoff, M.J. 1994. Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **51**: 83-89.
- Fang, X.P.; Rieser, M.J.; Gu, Z.M.; Zhao, G.X.; and McLaughlin, J.L. 1993. Annonaceous acetogenins: an update review. *Phytochemical Analysis*, **4(1)**: 27–48.
- Farnworth, N. 1988. *Screening plants for new medicines*. In: Wilson, E.O. (Ed.), *Biodiversity*, National Academy Press, Washington, DC.
- Freshney R.I. 2000. *Cytotoxicity*. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 4th ed, New York : Willey-Liss, pp 329-343.
- Gu, Z.M.; Zhao, G.X.; Oberlies, N.H.; Zeng, L.; and McLaughlin, J.L. 1995. Annonaceous acetogenins: Potent mitochondrial inhibitors with diverse applications. *Recent Advances in Phytochemistry*, **29**: 249–310.
- Hall, B.G. 1988. Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutation involving an insertion sequence. *Genetics*, **120**: 887-897.
- He, K.; Zhao, G-X.; Shi, G.; Zeng, L.; Chao, J-F.; and McLaughlin, J.L. 1997. Additional bioactive Annonaceous acetogenins from *Asimina triloba* (Annonaceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **5(3)**: 501-506.
- Hedner, K.; Högstädt, B.; Kolnig, A-N.; Mark-Vendel, E.; Strömbeck, B.; and Mitelman, F. 2004. Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and sex. *Journal Human Genetics*, **62(4)**: 305-309.

- Henderson, L.; Jones, E.; Brooks, T.; Chételat, A.; Chiliutti, P; Freemantle, M.; Howard, C.A.; Mackay, J.; Phillips, B.; Riley, S.; Roberts, C.; Wotton, A.K.; and van de Waart, E.J. 1997. Industrial genotoxicology group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies. *Mutagenesis*, **12(3)**: 163-167.
- Hrckova, G.; Velebny, S.; Daxnerova, Z.; and Solar, P. 2006. Praziquantel and liposomized glucan-treatment modulated liver fibrogenesis and mastocytosis in mice infected with *Mesocestoides vogae* (*M. corti*, Cestoda) tetrathyridia. *Parasitology*, **132(Pt4)**: 581-594.
- Hsu, Y.H. 1998. Tumor inhibition by several compounds extracted from *Hedyotis corymbosa* and *Hedyotis diffusa*. *Cancer Detection and Prevention*, **22(Suppl 1)**: S5-S56.
- Hu, Q.; Xu, J.; and Chen, L. 2005. Antimutagenicity of selenium-enriched rice on mice exposure to cyclophosphamide and mitomycin C. *Cancer Letters*, **220**: 29 – 35.
- Ismail, M.; Botros, S.; Metwally, A.; William, S.; Farghally, A., Tao, L.F.; Day, T.A.; and Bennett, J.L. 1999. Resistance to praziquantel: Direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60(6)**: 932-935.
- Jaramillo, M.C.; Arango, G.J.; Gonzalez, M.C.; Robledo, S.M.; and Velez, I.D. 2000. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, **71(2)**:183-186.
- Johnson, H.A.; Gordon, J.; and McLaughlin, J.L. 1996. *Monthly variations in biological activity of Asimina triloba*. In: Janick, J. (ed.), *Progress in new crops*, ASHS Press, Arlington, VA. pp 609-614.
- Kamuhabwa, A.; Nshimo, C.; and de Witte, P. 2000. Cytotoxic of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **70**: 143-149.
- Kapadia, G.J.; Sharma, S.C.; Tokuda, H.; Nishino, H; and Ueda, S. 1996. Inhibition effect of iridoids on Epstein-Barr virus activation by a short-term in vitro assay for anti-tumor promoters. *Cancer Letters*. **102**: 223-226.
- Keiser, J.; Brun, R.; Fried, B.; and Utzinger, J. 2006. Trematocidal activity of praziquantel and artemisinin derivatives: In vitro and in vivo investigations with adult *Echinostoma caproni*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **50(2)**: 803-805.
- Kim, G.S.; Zheng, L.; Alali, F.; Rogers, L.L; Wu., F.E.; McLaughlin, J.L.; and Sastrodihardjo, S. 1998. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, annomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Product*, **61(4)**:432-436.
- Kim, J.; and Park, E.J. 2002. Cytotoxic anticancer candidates from natural resources. *Current Medicinal Chemistry – Anti-cancer Agents*, **2(4)**: 485-537.

- Kumar, D.; Mishra, S.K.; Tandan, S.K.; and Tripathi, H.C. 1995. Possible mechanism of anthelmintic action of palasonin on *Ascaridia galli*. *Indian Journal of Pharmacology*, **27**: 161-168.
- Klanginsirikul P. 2003. *Genotoxic effect of Lannate on lymphocytes of agriculturists in Saraphi and Chom Thong districts Chiang Mai Province*. Thesis of Master of Science in Biology, Chiang Mai University, Chiang Mai.
- Laboeuf, M.; Cave, A.; Bhaumik, P.K.; Mukherjee, B.; and Mukherjee, R. 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21**: 2783-2813.
- Latha, P.G.; and Panikkar, K.R. 1998. Cytotoxic and antitumor principles from *Ixora coccinea* flowers. *Cancer Letters*, **130(1-2)**: 197-202.
- Lee, C.C.; and Houghton, P. 2005. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**: 237-243.
- Lewis, M.A.; Arnason, J.T.; Philogene, J.R.; Rupprecht, J.K.; and McLaughlin, J.L. 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the paw paw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **45**: 15-23.
- Liang, Y.S.; Coles, G.C.; and Doenhoff, M.J. 2000. Detection of praziquantel resistance in schistosomes. *Tropical Medicine and International Health*, **5(1)**: 72.
- Liang, Y.S.; Coles, G.C.; Doenhoff, M.J.; and Southgate, V.R. 2001. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1227-1235.
- Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, **49**: 57-68.
- Londerhausen, M.; Liecht, W.; Leib, F.; and Moeschler, H. 1991. Molecular mode of action of annonins. *Pesticide Science*, **33**: 427-438.
- Major, J.; Jakab, M.; Kiss, G.; and Tompa, A. 1994. Chromosome aberration, sister-chromatid exchange, proliferative rate index, and serum thiocyanate concentration in smokers exposed to low-dose benzene. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **23(2)**: 137-142.
- Maxwell, J.F. 2001. *Annotated enumeration of the vascular plants of Doi Suthep-Pui National Park*. In: Maxwell, J.F and Elliott, S. (Eds.), *Vegetation and Vascular Flora of Doi Suthep-Pui National Park, Northern Thailand*. Thai Studies in Biodiversity.
- McLaughlin, J.L.; Zeng, L.; Oberlies, N.H.; Alfonso, D.; Johnson, H.A.; and Cummings, B.A.; 1997. *Annonaceous acetogenins as new natural pesticides : recent progress*. In : Hedin, P.A.;

Hollingworth, R.M.; Miyamoto, J., Thompson, D.G., (Eds.), *Phytochemicals for pest control Symp. Ser. 658*, American Chemical Society: Washington, D.C., pp 117-133.

Mitchell A.D. 2000. *In vitro* genetic toxicity testing. In Gad S.C. (Ed), *In vitro Toxicology*, 2nd ed, New York-London, Taylor & Francis, pp 94-127.

Morre, D.J.; De Cabo, R.; Farley, C.; Oberlies, N.H.; and McLaughlin, J.L. 1995. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not Liver, plasma membranes. *Life Sciences*, **56**: 343-348.

Nair, S.C.; and Panikkar, K.R. 1990. Antitumor principles from *Ixora javanica*. *Cancer Letters*, **49(2)**: 121-126.

Nair, S.C.; Panikkar, B.; Akamanchi, K.G.; and Panikkar, K.R. 1991. Inhibitory effects of *Ixora javanica* extract on skin chemical carcinogenesis in mice and its antitumour activity. *Cancer Letters*, **60(3)**: 253-258.

Papazisis, K.T.; Geromichalos, G.D.; Dimitriadis, K.A.; and Kortsaris, A.H. 1997. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, **208**: 151-158.

Pedersen, O.; Gurib-Fakim, A.; Hussein, S.; and Adsersen, A. 1999. Pharmacological properties of seven medicinal plants of the Rubiaceae from Mauritius. *Pharmaceutical Biology*, **37(3)**: 202-207.

Raffauf, F.R.; Le Quesne, P.W.; and Ghosh, P.C. 1978. Antitumor plants. V. Constituents of *Cinchona pubescens*. *Lloydia*, **41(5)**: 432-434.

Ratnasooriya, W.D.; Deraniyagala, S.A.; Gathige, S.D.N.K.; Goonasekara, C.L.; and Jayakody, J.R.A.C. 2005. Antinociceptive action of aqueous extract of the leaves of *Ixora coccinea*. *Acta Biologica Hungarica*, **56 (1-2)**: 21-34.

Reid, W.V.; Laird, S.A.; Meyer, C.A.; Gamez, R.; Sittenfeld, A.; Janzen, D.H.; Gollin, MA.; and Juma, C. 1993. *Biodiversity prospecting: Using genetic resources for sustainable development*. World Resources Inst., Washington, DC.

Roth, A.; Kuballa, B.; Bounthan, C.; Cabalion, P.; Sevenet, T., Beck, J.P.; and Anton, R. 1986. Cytotoxic Activity of polyindoline alkaloids of *Psychotria forsteriana* (Rubiaceae) (1). *Planta Medica*, **6**: 450-453.

Rupprecht, J.K.; Hui, Y-H.; and McLaughlin, J.L. 1990. Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products*, **53(2)**: 237-278.

Sabah, A.A.; Fletcher, C.; Webbe, G.; and Doenhoff, M.J. 1986. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Experimental Parasitology*, **61(3)**: 294-303.

- Sakuma, M. 1998. Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology*, **33**: 339-347.
- Schweighoffer, F.; Ait-Tkhlef, A.; Resnink, A.; Brinkman, B.; Melle-Milovanovic, D.; Laurent-Puig, P.; Kearsy, J.; and Bracco, L. 2000. Qualitative gene profiling: a novel tool in genomics and in pharmacogenomics that deciphers messenger RNA isoforms diversity. *Pharmacogenomics*, **1(2)**: 187-197.
- Sing, R.; Khan, N.U.; and Singhall, K.C. 1996. *In vitro* antifilarial activity of *Sencio nudicaulis* Buch.Ham. effect on *Setaria cervi* (Nematoda : Filarioidea). *Indian Journal of Physiological Pharmacology*, **40**: 231-236.
- Singh, A.; and Singh, D.K. 2004. Effect of herbal molluscicides and their combinations on the reproduction of the snail *Lymnaea acuminata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **46(4)**: 470-477.
- Suffness, M.; and Pezzuto, J.M. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K., Ed., *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, Vol.6. Academic Press, London, pp. 71-133.
- Tanamatayarat, P. 2000. *Cytotoxic activity screening of some Rubiaceae plants in Northern Thailand*. MSc Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Tuchinda, P.; Udchachon, J.; Reutrakul, V.; Santisuk, T.; Taylor, W.C.; Farnsworth, N.R.; Pezzulo, J.M.; and Kinghom, A.D. 1991. Bioactive butenolides from *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry*, **30(8)**: 2685-2689.
- Walen, K.H. 2002. The origin of transformed cells: studies of spontaneous and induced cell transformation in cell cultures from marsupials, a snail and human amniocytes. *Cancer Genetics and Cytogenetic*, **133**: 45-54.
- Wang, L.Q.; Min, B.S.; Li, Y.; Nakamura, N.; Qin, G.W.; Li, C.J.; and Hattori, M. 2002. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **10(3)**: 561-565.
- Wang, Y.-C.; and Huang, T.-L. 2005. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **43**: 295-300.
- Whitfield, P.J. 1995. Plant allelochemicals and the control of parasites. *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology*, **5**: 5-18.
- Whitfield, P.J. 1977. *The Biology of Parasitism*. Edward Arnold (Publisher) Limited, London, UK. 277p.

- Woo, S.H.; Reynolds, M.C.; Sun, N.J.; Cassady, J.M.; and Snapka, R.M. 1997. Inhibition of topoisomerase II by liriodenine. *Biochemical Pharmacology*, **54**: 467-473.
- Wu, Y.C.; Hung, Y.C.; Chang, F.R.; Cosentino, M.; Wang, H.K.; and Lee, K.H. 1996. Identification of ent-16 beta, 17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *Journal of Natural Product*, **59**: 635-637.
- Wurgler, F.E.; and Kramers, P.G. 1992. Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis*, **7**(5): 321-327.
- Wutthi-Dramawetch, W. 1977. *The encyclopedia of Medicinal Plants of Thailand : The Thai Pharmacology and Ethnobotany*. The Odian Store Publishing Co., Ltd., Bangkok. (Publish in Thai).
- Yazbak, A.; Sinha, S.C.; and Keinan, E. 1998. Total synthesis of Uvaricin. *Journal of Organic Chemistry*, **63**: 5863-5868.
- Yu, J.G.; Liu, D.; Xu, L.Z.; and Yang, S.L. 1997. Studies on chemical structures of two iso-acetogenins from *Annona reticulata*. *Yao Xue Xue Bao.*, **32**: 914-919.
- Zafra-Polo, M.C.; Figadère, B.; Gallardo, T.; Tormo, J.R. and Cortes, D. 1998. Natural acetogenin from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*, **48**(7): 1087- 1117.
- Zeng, L.; Wu, F.E.; Oberlies, N.H.; McLaughlin, J.L.; and Sastrodihadjo, S. 1996. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, **59**: 1035-1042.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ มี 1 เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ไปแล้ว คือ

Wongkham, W. and Whitfield, P.J. 2004. *Pallisentis rexus* from the Chiang Mai Basin, Thailand: ultrastructural studies on egg envelope development and the mechanism of egg expansion. *Journal of Helminthology*, 78 : 77-85

(โปรดดู reprint ใน ภาคผนวก 1)

งานตีพิมพ์ที่กำลังรอการตอบรับจากวารสารวิชาการนานาชาติ อีก 1 เรื่อง คือ

Wongkham, W.; Bartlett, A.; Jatisatienr, A.; Sobhon, P. and Whitfield, P.J. 2006.

Anthelmintic and anticancer activities of the crude extracts of some species from the two plants families; Annonaceae and Rubiaceae, from Thailand. *Journal of Ethnopharmacology*, XX, XXX-XXX.

(โปรดดู manuscript ใน ภาคผนวก 2)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เชิงพาณิชย์ จากผลงานวิจัยนี้พบว่ามีพืชจำนวนหนึ่งที่มีศักยภาพที่จะนำมาศึกษาในรายละเอียดถึงโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำคัญ และนำมาทดสอบทางยาได้ แต่เนื่องจากไม่สามารถเปิดเผยรายละเอียดได้ในขณะนี้ คณะผู้วิจัยหวังว่าการทดสอบสารออกฤทธิ์เหล่านี้ในอนาคตอันใกล้ จะทำให้สามารถนำสารสำคัญเหล่านี้มาพัฒนาเป็นยาที่ใช้กับมนุษย์และสัตว์ได้

2.2 เชิงนโยบาย หากทาง สกว. มีนโยบายส่งเสริมให้ห้องปฏิบัติการในมหาวิทยาลัยใน ส่วนภูมิภาคได้มีโอกาสพัฒนาให้เกิดความเชี่ยวชาญ และมีศักยภาพที่ดีขึ้นได้ เชื่อได้เลยว่า การค้นคว้าวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติในประเทศจะรุ่งเรืองไปได้ อย่างรวดเร็ว อีกประการหนึ่ง การพัฒนาความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านให้มีขึ้นในแต่ละห้องปฏิบัติการ จะทำให้เกิดความร่วมมือและลดความซ้ำซ้อนของงาน และของการใช้งบประมาณลงไปได้มาก แต่มีได้หมายความว่า จะให้มีการผูกขาดด้านการวิจัยอยู่ในกลุ่มนักวิจัยหรือหน่วยงานใดหน่วยงานเดียว ซึ่งจะทำให้เกิดผลเสียเมื่อมีงานมากขึ้น หรือเกิดความล้มเหลวบกพร่องขึ้นก็จะขาดความต่อเนื่องและไม่มีการช่วยเหลือกันได้

2.3 เชิงสาธารณะ ได้มีการสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับนักวิจัยระหว่างหน่วยงานทั้งในและต่างประเทศดังนี้

2.3.1 ในประเทศ

ดร. ประสาท กิตตะคุปต์

ห้องปฏิบัติการวิจัยทรัพยากรชีวภาพ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เลขที่ 113 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง

จ. ปทุมธานี 12120

ดร. พุฒินันท์ มีเฟาพันธ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จ. เชียงใหม่ 50200

Dr. Patricia Watts หัวหน้าห้องปฏิบัติการ

คุณ สุกฤตยา วีระนนท์ ผู้ช่วยนักวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเซลล์สัตว์

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

หน่วยปฏิบัติการกลางไบโอเทค

113 ถ. พหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง

จังหวัดปทุมธานี 12120

รศ.ดร. วัชระ กลิณฤกษ์

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก, คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50200

ดร. ชูศรี ไตรสนธิ; ผศ. ปรีทรรคน์ ไตรสนธิ

ห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50200

ศ. ดร. ประเสริฐ ไสภณ; ศ. ดร. สุชาติ อุปถัมภ์

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์,

มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 10400

2.3.2 ต่างประเทศ

Dr. R.H. Clothier; Dr. N. Khammo

FRAME Alternatives Laboratory,

School of Biomedical Sciences,

University of Nottingham, UK.

Prof. J. Barrett; Dr. P.M. Brophy; Dr. J. Hamilton

Parasitology Group, Institute of Biological Sciences,

University of Wales
Aberystwyth, Ceredigion, Walse, UK.

Dr. Stephen Minger

Stem Cell Center
Wolfson Center for Age Related Disease
King's College London, U. of London,
London, United Kingdom.

Prof. Dr. Philip J. Whitfield and Dr. Ann Bartlett
Immunity and Infection Research Unit,
Department of Biochemistry,
King's College London, U. of London,
London, United Kingdom.

Prof. Dr. Omar M. Amin
Institute of Parasitic Diseases,
Tempe, Arisona 85285, USA.

Prof. Dr. Horst Taraschewski
Zoologische Inst. Abt., Okologie, Univ. Karlsruhe,
Karlsruhe 76128, Germany.

2.4 เชิงวิชาการ ได้มีการพัฒนาการเรียนการสอน และการผลิตบัณฑิต อันมีงานวิจัย
เกี่ยวเนื่องกับโครงการนี้หรือใช้เทคนิคที่เกี่ยวข้องกัน ดังนี้

2.4.1 ระดับมหาบัณฑิต (ปริญญาโท)

- | | |
|---|---------------------|
| - นางสาว วราภรณ์ แก้วคอน รหัส | สำเร็จการศึกษา 2545 |
| - นาย กมล ดาสา รหัส 4325216 | สำเร็จการศึกษา 2548 |
| - นางสาว ศิริมนัส แสงงาม รหัส 4625126 | กำลังศึกษา |
| - นางสาว กรกต อรรถนสุพัตติ รหัส 4725001 | กำลังศึกษา |
| - นางสาว เกวสิน อินทนนท์ รหัส 4825004 | กำลังศึกษา |
| - นางสาว ปัทมาธิตา เสียงดี รหัส 499931033 | กำลังศึกษา |

2.4.2 ระดับดุษฎีบัณฑิต (ปริญญาเอก)

- | | |
|--|---------------------|
| - นาย วาที คงบรรทัด รหัส 4579530 | สำเร็จการศึกษา 2549 |
| - นางสาว ฤดีวรรณ ตั้งประดิษฐ์ รหัส 4679508 | กำลังศึกษา |
| - นางสาว ปิโยรส หงสาชาติ รหัส 4679505 | กำลังศึกษา |

3. อื่นๆ

3.1 ผลงานที่กำลังจัดเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ จำนวน 1 เรื่อง คือ
Dasa, K.; Wongkham, W.; Mevatee, A.; Jariyawidhyawat, P.; and Kangwanpong, D.

2006. Genotoxicity effects and the chromosome aberration of the ethanol crude extracts from annonaceous plants. Chiang Mai Journal of Science, XXX : XXX-XXX.

(โปรดดู manuscript ใน ภาคผนวก 3)

3.2 ได้มีการเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมวิชาการจำนวน 4 เรื่อง ดังนี้

1. เรื่อง"ผลของสารสกัดด้วยเอธิลอัลกอฮอล์จากกานพลูต่อหนอนตัวกลม

Caenorhabditis elegans การประชุม วทท. ครั้งที่ 28 ระหว่างวันที่ 24-26 ตุลาคม 2545 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ

2. เรื่อง"Toxicity assay of ethanolic crude extract from *Mammia siamensis* Kost."

การประชุม The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare ระหว่างวันที่ 3-7 กุมภาพันธ์ 2546 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่

3. เรื่อง"ผลของ piperine ต่อ *Caenorhabditis elegans* และ เซลล์เชื้อสายมะเร็ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับไฟโบรบลาสต์ปกติของไก่"การประชุม วทท. ครั้งที่ 32 ระหว่างวันที่ 10-12 ตุลาคม 2549 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ

4. เรื่อง"การศึกษาลักษณะเฉพาะของเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ"การประชุม วทท. ครั้งที่ 32 ระหว่างวันที่ 10-12 ตุลาคม 2549 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

Pallisentis rexus from the Chiang Mai Basin, Thailand: ultrastructural studies on egg envelope development and the mechanism of egg expansion

W. Wongkham¹ and P.J. Whitfield^{2*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand; ²School of Health and Life Sciences, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NN, UK

Abstract

Pallisentis rexus Wongkham & Whitfield, 1999 (Eoacanthocephala: Quadrigyridae) infects the freshwater snakehead fish, *Channa striata*, in the Chiang Mai Basin, Thailand. All stages of egg development within the body cavity of the female parasite were observed, using transmission electron microscopy. Changes in mature eggs after contact with water were also investigated. The mature egg has five egg envelopes separated from each other by four gaps. The fertilization membrane, which is formed first, is pushed centrifugally by other, subsequently formed, envelopes and gaps, which produces a final total shell thickness of 8–36 µm around the acanthor. The disappearance of the outermost layer and the unpleating of an adjacent inner layer causes the expansion of eggs on contact with water. The volume of an expanded egg is approximately 27 times that of an unexpanded one, but the density of eggs is reduced from a value greater than water to one almost equal to water. This is believed to aid the dispersion of eggs.

Introduction

Pallisentis rexus (Wongkham & Whitfield, 1999) infects the freshwater snakehead fish, *Channa striata*, in the Chiang Mai Basin, northern Thailand. The parasite completes its larval development (by reaching the cystacanth stage) within 13 days in *Cyclops* sp. and can employ several species of copepods as intermediate hosts (Wongkham, 1998).

The structure of the egg envelope has been studied in many species of acanthocephalans. Crompton (1985) concluded that the parasite eggshell is composed of three to four envelopes. The precise number is dependent on

the species of acanthocephalan concerned. The ultrastructure of the acanthocephalan eggshell has been studied by Whitfield (1973) and Marchand (1984a,b) in several species of Acanthocephala. In all species it was reported that there are four solid envelopes separated by four fluid/granular gaps. Peter *et al.* (1991), Taraschewski & Peter (1992) and Taraschewski *et al.* (1992) have extended the findings of Marchand (1984a,b) in the Archiacanthocephala, Palaeacanthocephala and Eoacanthocephala.

The observations of the present study were aimed at providing a detailed description of the development and final configuration of the egg envelopes of the eoacanthocephalan, *P. rexus*. These studies have also facilitated the first ultrastructural study into the mechanism by which mature eggs of acanthocephalans in the genus *Pallisentis* expand enormously when they

*Author for correspondence
Fax: 020 7848 4195
E-mail: phil.whitfield@kcl.ac.uk

เลขหมู่.....

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

contact fresh water (Rai, 1967; George & Nadakal, 1973; Wongkham, 1998).

Materials and methods

Living specimens of locally caught *Channa striata* were purchased from several markets in Chiang Mai town. Living gravid female worms of *P. rexus* parasites were obtained at autopsy from the fish intestine and washed in normal saline. They were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for at least 3–6 h at 8–10°C and washed in the same buffer. To aid fixative penetration, the bodies of worms were cut transversely into sections 2–3 mm in length. Central body sections containing eggs within the pseudocoelome were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, dehydrated in ethanol and propylene oxide, and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were cut on a Reichert Ultracut E ultramicrotome, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Jeol 100CX MKII transmission electron microscope (TEM). The sections were examined for the different stages of egg development.

Live gravid female *P. rexus* parasites from purchased fishes were placed in a culture dish containing spring water. Released mature eggs were immediately transferred to a new dish and stored in spring-water for 5–7 days until fully expanded. They were concentrated by centrifugation in water at 5000 rpm and then processed as

above for electron microscopy. Sections were examined to investigate the expanded configuration of parts of the egg envelope series. Some eggs were kept in spring water for longer periods of time to investigate possible changes after expansion.

Results

Ultrastructure of the mature eggs within the female parasite body cavity

In the mature egg, a number of egg envelopes are concentrically arranged around the enclosed acanthor. There are four solid envelopes (E1–E4) corresponding to those which have been described in other acanthocephalan eggs (Peter *et al.*, 1991; Taraschewski & Peter, 1992; Taraschewski *et al.*, 1992). There is also, however, an additional external envelope (E0) in the case of *P. rexus* eggs, which seems to be derived from the oocyte fertilization membrane. These envelopes are separated by four gaps (G0–G3), which are filled with different, presumably liquid material (figs 1 and 2). There is also a gap (G4) between E4 and the acanthor. This gap is filled with highly osmiophilic material. E0, measuring 0.05–0.15 µm in thickness, is an electron-dense layer. E1 is an electron-dense layer with a thickness of approximately 0.05–0.15 µm. A characteristic of this layer is its regular folding or pleating with pleat amplitudes of 2–3 µm (fig. 2). The inner clefts of the pleating, which are



Fig. 1. Transmission electron micrograph of mature egg envelopes. The solid layers are labelled as E0–E4 and the gaps as G0–G4. The acanthor (AC) is clearly seen with a nuclear mass at its centre. Scale bar = 5 µm.

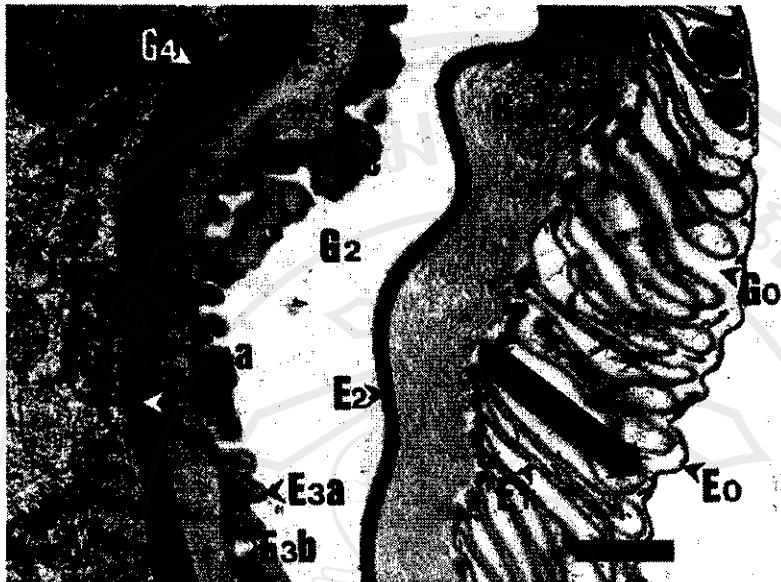


Fig. 2. Transmission electron micrograph of mature egg envelopes. Envelopes and gaps are labelled as in fig. 1. The pleat amplitude of E1 is indicated by a double-headed arrow. Scale bar = 1 μ m.

confluent with gap G1, contain osmiophilic granulation. The outer clefts of E1 are part of the gap G0, which is filled with electron-lucent material enclosed by the outermost layer E0.

The gap G1, between the basal part of E1 and E2 is 0.7–1.6 μ m wide, and, like the inner clefts of E1, contains dense osmiophilic filamentous material. E2 is a further electron-dense layer measuring of 0.1–0.3 μ m in thickness. Gap G2, situated between E2 and E3 is filled with electron-lucent material and a few osmiophilic granules. This gap is seen by light microscopy as a clear zone between E2 and the acanthor. The width of this gap at each pole of the mature egg is approximately 15–27 μ m and 5–10 μ m at the equator.

E3 consists of three clearly demarcated layers (fig. 2). E3a is a thin corrugated electron-dense membrane-like layer measuring 0.04–0.1 μ m in width. This layer is characterized by irregular clefts and curvatures inside which are two additional layers of electron-dense material (E3b and E3c). The fine dense osmiophilic granules of E3b are immediately beneath the inner clefts of E3a. The patchy clumps of coarse electron-dense granules of E3c (0.0–0.06 μ m in width) are attached to the inner side of E3b (0.05–0.1 μ m in width). These two layers (E3b and E3c) are separated from E4 by gap G3. This gap measures 0.0–0.7 μ m in width with osmiophilic granular contents.

E4 can be distinguished into two layers, the outer E4a layer and the inner E4b layer (fig. 3). E4a measured 0.01–0.05 μ m in width and is composed of dense osmiophilic granules in an irregular layer above E4b. E4b, the innermost solid layer of the envelope series is thick and

dense and measures 0.2–0.5 μ m in width. It has a very characteristic internal substructure which consists, in transverse section, of an alternating series of electron-dense and electron-lucid lines which are arranged perpendicular to the underlying acanthor surface (figs 2 and 3). The dense line to dense line spacing in this array is about 20 nm. The G4 gap between E4 and the outer surface of the acanthor is filled with extremely electron dense material.

Egg envelope development

The initial stage of envelope development is represented by a single electron-dense layer called here the fertilization membrane (Fm) (fig. 4A), with a thickness of 0.05–0.15 μ m. This membrane is probably synonymous with E0 in later terminology. A translucent zone (Cz) measuring 0.05–0.5 μ m between the fertilization membrane and the developing acanthor is also clearly observed. This translucent zone is filled with osmiophilic granules and all the other egg envelopes are formed within this zone.

The fertilization membrane, which is formed first, is gradually pushed centrifugally by the other envelopes and gaps which are formed internal to the fertilization membrane (figs 4 and 5). The process of envelope synthesis and secretion, from the surface of the developing acanthor, is associated with an accumulation of granular endoplasmic reticulum and secretory vesicles at the periphery of the outer layer of embryonic cytoplasm (fig. 4); these organelles may also be concerned with processes other than envelope synthesis. The images in

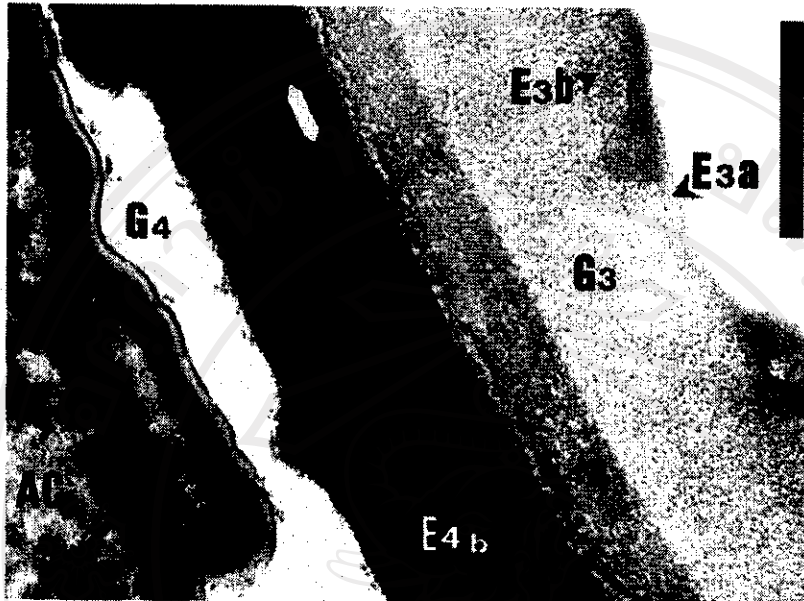


Fig. 3. Transmission electron micrograph of egg envelopes E3 and E4. Labels in this figure are as described in fig. 511. The distance between seven adjacent dense lines in E4b is marked with a double-headed white arrow. Scale bar = 500 nm.

fig. 4 represent stages in the generation of the egg envelope series from a stage when only the fertilization membrane is present (fig. 4A) to a much later stage (fig. 4F) in which the elaboration of envelope E4b is beginning.

The full sequence of envelope development stages is illustrated in a series of scale diagrams in fig. 5. It shows the enormous expansion of the gap between the fertilization membrane (later E0) and the developing acanthor. This gap, within which the envelope series develops, is initially only 0.05–0.2 μm in width, but by the time that the mature egg envelope series is in place, the gap is 8–36 μm wide.

Although a large number of stages in the process of envelope secretion have been observed in different TEM images, it is not possible to accommodate all of them in a single unambiguous sequence. The sequence shown in figs 4 and 5, however, seems to describe the ordered formation of almost all envelopes and their sub-layers. The eight developmental stages illustrated diagrammatically in fig. 5 constitute three major phases of synthesis.

In the first phase (stages A–D, fig. 5) there is little expansion of the initial Gz gap but the foundations of envelopes E2 and E3 are laid down as simple dense layers. It is possible that the dense layer inside E2 and immediately above the embryonic surface is the foundation of E4. In the second phase (stages E–F, fig. 5), considerable expansion of the initial Gz gap begins to occur and E2 and E3 begin to become more elaborate. Simultaneously, the complex pleated layer of envelope E1 forms in the gap between the fertilization membrane and

E2, within very dense material filling the gap between the fertilization membrane and E1. By stage F (fig. 5) there are more explicit signs that E4 is in place. In the final phase (stages G and H, fig. 5) even more Gz expansion occurs and major alterations happen to both gap G1 and envelope E4. G1 becomes filled and expanded with fibrous material and the ordered structure of E4b becomes apparent. By the end of stage H, the mature egg envelope series is in position.

Egg expansion in water

Ultrastructural analysis of expanded eggs (figs 6A & B) shows that E0 disappears when eggs come into contact with spring water and that layer E1 beneath it unpleats and expands providing the physical basis for egg expansion. The initial unpleating of E1 always begins at the equator of the egg and symmetrically expands the boundary of the unpleating to both poles (fig. 7). This results in increasing width and length of the eggs and within 6–72 h in spring water, the mature eggs can reach their fully expanded length (0.42–1.40 mm, with a mean of 0.79 ± 0.24 SD). There is, however, a pleated part of E1 which remains at both poles of the fully expanded egg, which is referred to here as a 'folded cap' (fig. 7). The fully expanded E1 envelope is fusiform in shape and contains the unexpanded components of the egg, that is: E2, E3, E4, C2, C3, C4 and the acanthor. In the expanded egg these parts are presumably bathed in a mixture of the G1 contents and spring water which has permeated E1. The expanded egg is almost eight times the length and approximately twice the width of the unexpanded mature egg (table 1).

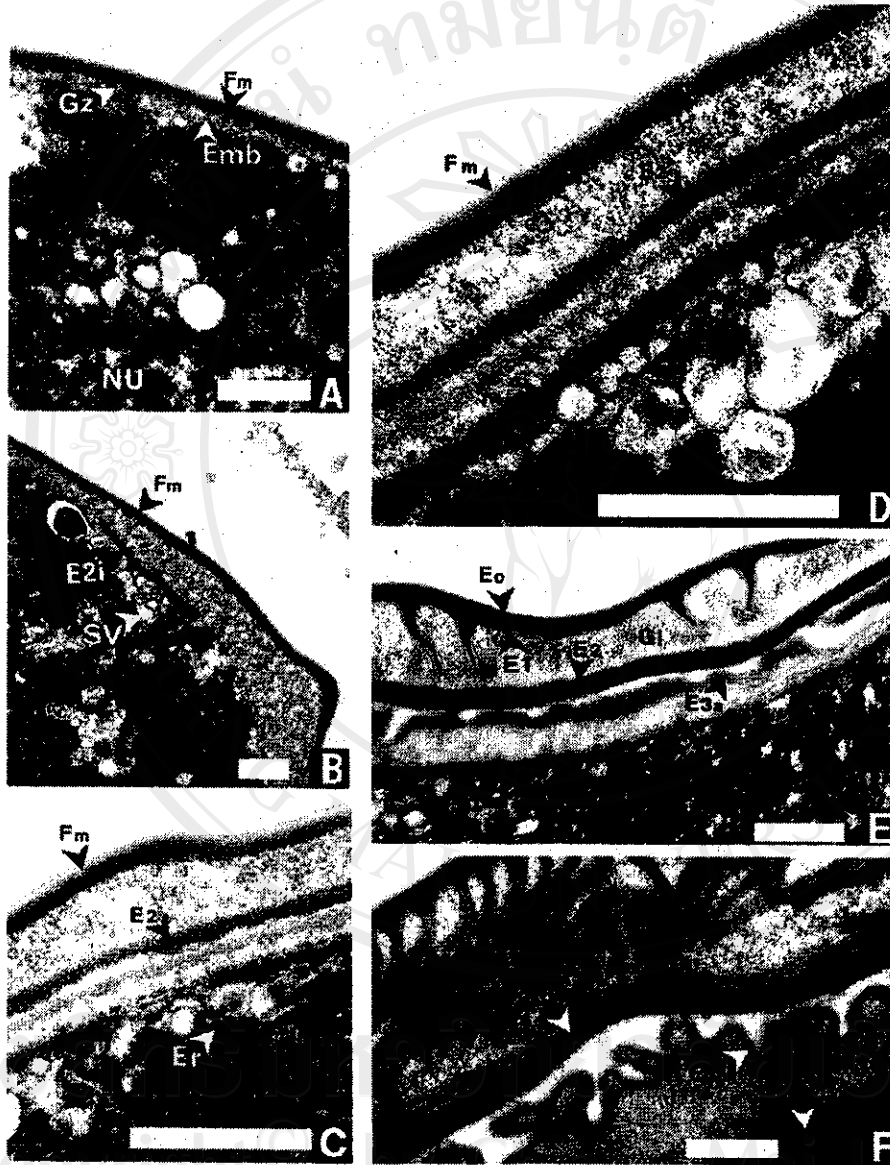


Fig. 4. Transmission electron micrographs of entire egg envelope sequence at six different stages of development (A-F). Each scale bar = 0.5 μ m. A. There is an initial gap (Gz) between the fertilization membrane (Fm) and the embryonic membrane (Emb). A nucleus of an embryo (NU) can also be seen. B. E2i is the initial stage of E2 subtended by secretory vesicles (SV). C. E2i is pushed outwards while E3 and E4 form beneath. Note the active endoplasmic reticulum (Er) and secretory vesicles at the surface of the acanthor. D. Later stage of development with four solid layers being formed. E. The fertilization membrane can be separated into two parts E0 and E1. E2 and E3a are also distinguishable. F. E2, E3a and E4b are distinguishable and pleats in E1 are obvious.

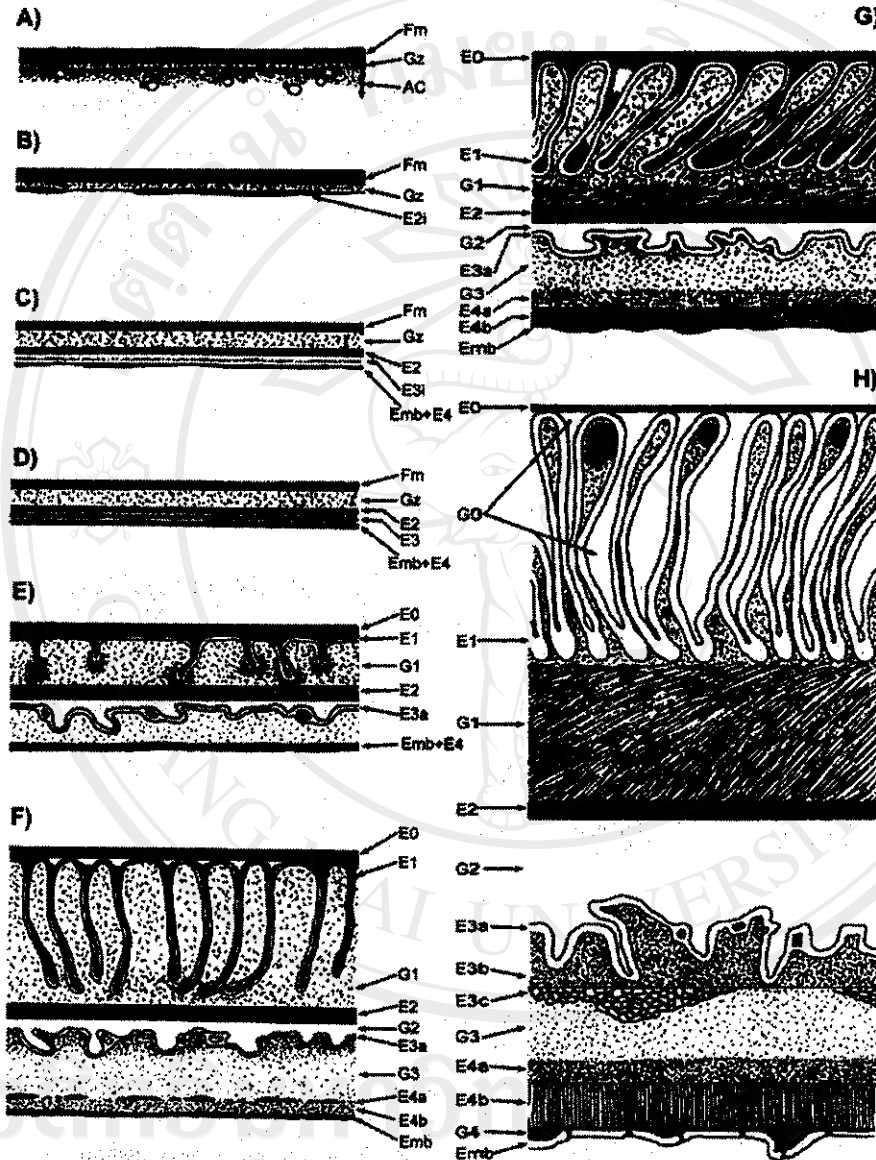


Fig. 5. Scale diagrams representing egg envelope formation in chronological sequence A-H. Each diagram represents a width of $3 \mu\text{m}$ of the developing envelope series.

Approximately 80% of expanded eggs stored in the spring water were found to be resting in the vertical position with an egg pole 'attached' to the glass surface. These adhesive expanded eggs were not easily removed or detached by stirring the surrounding water since they

remained attached to the glass surface by means of the folded cap and swung with water movements. Eggs kept in spring water longer than 2-3 days lost their polar adhesive property. Bacteria often covered the outer surface of expanded eggs left in spring water for a few

Table 1. *Pallisentis rexus*: the linear dimensions and volume of unexpanded and expanded eggs.

Egg	Size range (length × width in mm)	Mean length (mm)	Mean width (mm)	Estimated volume (mm ³)
Unexpanded	0.096–0.116 × 0.036–0.048	0.107	0.042	0.000099
Expanded	0.42–1.4 × 0.06–0.11	0.790	0.080	0.002646

Volume, V estimated from $V = 4/3\pi r^2h$ where $r = 1/2$ mean width and $h = 1/2$ mean length.

weeks, but were never found in G1 or in the other gaps beyond (fig. 6).

Discussion

Structure of the egg envelopes

The structural arrangement of mature egg envelopes for *P. rexus* is similar to that described for *P. golzani* by Marchand (1984b). The size and thickness of each layer, however, differs between the two species (table 2).

The initial stage of formation of E0 is similar to that described for the fertilization membrane in *Acanthosentis acanthuri* (Eoacanthocephala) by Marchand (1984a), *Moniliformis dubius* (Archiacanthocephala) by Wright (1971) and *Polymorphus minutus* (Palaeanthocephala) by Whitfield (1973). Most authors agree that the fertilization membrane remains around the developing acanthor as the outer envelope of a series. West (1964) and Wright (1971) have proposed that this membrane is the innermost envelope, but have failed to demonstrate explicit evidence to support their opinion. It is clear in the present study that this membrane is initially secreted by the fertilized egg, after which it is gradually pushed centrifugally by the development of the new envelopes and the gaps. The derivatives of the fertilization membrane therefore remain as the outermost envelope of the shell. The same phenomenon has been described by Sranack (1972) in

Pomphorhynchus laevis, Whitfield (1973) in *Polymorphus minutus* and Marchand (1984a) in *A. acanthuri*.

The homogeneous transparent nature of E1 seems to characterize all species of eoacanthocephalans (Marchand, 1984a,b). The pleated ultrastructural configuration of this layer was probably misunderstood by Marchand (1984b) who referred to it as 'irregular shaped tubules' in *Pallisentis golzani*. However, the density of pleats in this layer in *P. golzani* (approx. 30 pleats per 3 µm) illustrated in the photomicrograph provided by Marchand (1984b) is more than that in *P. rexus* (approx. 10–12 pleats per 3 µm). The pleated configuration of E1 clearly plays a crucial role in facilitating egg expansion.

E1, referred to as E1b by Marchand (1984a,b), has different appearances among other eoacanthocephalan species. In three genera this envelope has a corrugated character with a different overall configuration and a lesser degree of pleating than that found in *Pallisentis*. Examples include the two species described by Marchand (1984a), *Neoechinorhynchus agilis* and *Temisentis niloticus*, as well as *Neoechinorhynchus rutili* described by Taraschewski *et al.* (1992). Egg expansion has not been described in these species.

E1 has a filamentous structure in three species of the genus *Acanthosentis*, namely: *A. acanthuri* (Marchand, 1984a), and *A. tilapiae* and *A. papilio* (Marchand, 1984b). The shape, size and characteristics of the filaments are different in each species. In addition, there are interior connections between the E1 and E2 layer in *N. rutili* (Taraschewski *et al.*, 1992) which maintain the distance between the two layers. These structures have never been found in *P. rexus*.

E2, with its dense, concentrically arranged filaments, is apparently similar in the mature eggs of all eoacanthocephalan species (Marchand, 1984 a,b; Taraschewski *et al.*, 1992). In *P. rexus*, these fine filaments develop early during eggshell formation with an arrangement perpendicular to the surface of the acanthor. These filaments later become reinforced and appear as an electron-dense layer during the later stages of development. In all the investigated eoacanthocephalan species, this envelope contains keratin (Marchand, 1984 a,b; Taraschewski *et al.*, 1992). The chemical composition of the E2 layer supports the suggestion that its role is one of protection and impermeability to water.

The characteristics of E3 and E4 are very similar among all species of eoacanthocephalans that have been studied before (Marchand, 1984 a,b; Taraschewski *et al.*, 1992). E3 may be accompanied by one or two amorphous electron-dense materials, which differ between the species. The chemical composition of this layer is different in the three classes of Acanthocephala (Taraschewski *et al.*, 1992).



Fig. 6. Transmission electron micrographs of the unpleating of E1 in contact with spring water (E0 has disappeared). A. Early expansion stage with most pleats of E1 straightened out and some fibrous material still present in G1 (scale bar = 1 µm). B. Later stage of expansion of E1 with bacteria (Ba) on its outer surface and very little fibrous material visible inside (scale bar = 10 µm).

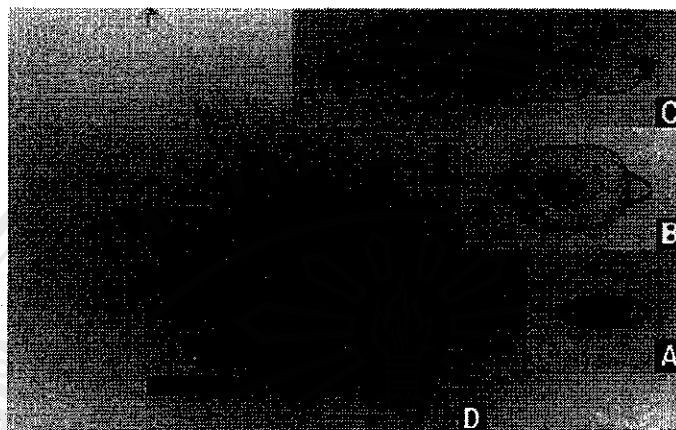


Fig. 7. Photomicrographs of sequential stages of mature egg expansion in spring water. Four eggs are illustrated at the same magnification (scale bar = 100 μm) and at successive stages of expansion, A–D: A, unexpanded egg; B, envelope E1 has begun to expand in its equatorial regions with the polar regions still unexpanded; C, most of E1 has now expanded but there remains at each polar region a small folded cap (FC); D, maximum expansion of E1.

The structure of E4 in *P. rexus* is similar to that described for other species of eoacanthocephalan (Marchand, 1984a,b; Taraschewski *et al.*, 1992). Peter *et al.* (1991) and Taraschewski *et al.* (1992), concluded that neither chitin nor keratin has been found in this layer in eoacanthocephalans.

Wongkham (1982) microscopically examined expanded eggs of *Pallisentis* sp. (almost certainly *P. rexus*, as in this study) during the process of experimental infection of the intermediate host (*Cyclops* sp.). The copepod consumed the acanthor and most of the egg envelopes including E2, but in most cases had not eaten the expanded E1 envelope. A tear was always visible in the rejected layer. We can probably conclude, therefore, that the envelope layers from E2 inwards

may play an important role in the protection of the acanthor from potential mechanical damage caused by the copepod mouthparts.

Egg expansion

Egg expansion in contact with water seems to be a common and distinctive feature of the genus *Pallisentis*. Two other members of this genus have been described as undergoing egg expansion, namely *P. nagpurensis* (George & Nadakal, 1973) and *P. panadei* (Rai, 1967). However, the nature of the expansion in these species was only described in these publications in a preliminary manner and the descriptions do not include information on the expansion mechanism. From the results of the present study on the structure of eggs, before and after expansion, three factors can be hypothesized to control the expansion process: (i) the elimination of E0 which acts as a 'shrink-wrap' around E1 in its pleated configuration; (ii) the subsequent increase in the permeability of E1 to water; and (iii) an osmotic pressure difference between the two sides of E1, causing an ingress of water through E1 resulting in the hydration and solution of the dense filamentous material (see fig. 2) in the space under E1. This ingress of water increases the volume within E1 and hydraulically expands E1 causing the straightening of its pleated configuration.

E0 is well preserved in the environmental medium of the female parasite body cavity. Only in certain environmental conditions after egg release is E0 eliminated. Wongkham (1998) has shown that E0 elimination and egg expansion occurs most rapidly and completely at pH values between 5.0 and 6.5 and in aqueous solutions containing low molarities of mineral salts, equivalent to around 0.02 M NaCl. Only after the disappearance of the E0, can E1 unpleat and expand. As the unpleating and expansion of E1 occurred, G1 increased in width. E2

Table 2. Thickness (μm) of the egg envelopes and gaps in *Pallisentis golvani* and *P. rexus*.

Egg envelopes	<i>P. golvani</i>	<i>P. rexus</i>
E0	0.02	0.05–0.15
E1 thickness	0.01*	0.05–0.15
E1 amplitude of pleats	1.0–1.4*	2–3
G1	0.1–0.5	0.7–1.6
E2	0.04–0.05	0.1–0.3
G2	0.1–1.0	5–27
E3a	0.01	0.04–0.1
E3b	0.035–0.7	0.05–0.1
E3c	–	0.0–0.06
G3	0.0–0.15	0.0–0.7
E4a	0.03	0.01–0.5
E4b	0.15–0.2	0.2–0.5
Total (approx)	1–4	8–36

The name and the width of each envelope of *P. golvani* is adapted from those described by Marchand (1984b). *Measured from the images in Marchand (1984b).

and the remaining egg envelope layers, together with all the gaps (C2–C4), have never been found to expand or increase in width and length. This characteristic is probably indicative of the rigid nature of E2 and its impermeability to water.

The unexpanded egg has a density significantly greater than that of water and sinks rapidly to the bottom of a water column. When the egg expands, its volume is approximately 27 times that of the unexpanded egg and the whole of this expansion seems to be caused by ingress of the water (with a density of 1 g ml^{-1}). If the density of the unexpanded egg is assumed to be, say, 1.2 g ml^{-1} , it follows that the density of the expanded egg will be $27.2 \div 27$ which is 1.0074 g ml^{-1} . In other words, the expansion has reduced the density of the egg to a value very close to that of water. This helps to explain the observation that expanded eggs were moved and dispersed with greater ease in water than the unexpanded eggs.

The phenomenon of egg expansion may facilitate copepod infection by two potential mechanisms given the previous finding by Wongkham (1998) that the acanthocephalan can successfully employ a range of copepod species as intermediate hosts. In the first few days after release from a female worm, the expanded egg retains a sticky property on both poles and will attach to the substratum in a 'vertical' orientation. In this 'benthic' phase the fixed position and extension of the egg about 1 mm above the substratum surface may increase the chances of encounters with bottom-browsing benthic copepod species. On losing their sticky property, the eggs (with water-like density) spend their longer planktonic period floating freely in the stirred region of the water column, which increases their infection chances with respect to planktonic copepod species.

The chemical composition of the gaps in the egg envelope series may also play an important role in increasing the chance of infection. According to Taraschewski *et al.* (1992) all the gaps of the egg shell of the eoacanthocephalans, *Neochlorhynchus rutili* and *Paratenuisentis ambiguus* contain different kinds of polysaccharide compounds. It is assumed that these polysaccharides are also present in *Pallisentis rexus*. The intermediate host may be attracted by these polysaccharides in the G1 as nutrients which in turn improve the probability of infection.

The regular pleating of E1 appears to be a unique characteristic of the genus *Pallisentis* and is obviously associated with the layer's capacity to expand. The mechanism by which the pleated E1 between E0 and E2 is formed remains an area to be studied. Presumably the constituents of E1 are secreted into the space between E0 and E2 and here self-assemble into the E1 layer. Why this self-assembly results in an already pleated configuration is unclear.

Acknowledgements

We would like to express our special thanks to Dr R.G. Bailey (King's College London) and Associate Professor O.B. Parkobvitayakit (Chiang Mai University) for their help and advice. Thanks are also due to Mr J. Pacey, Dr T. Brain and Ms Jane Storey at the

EM-Unit, Division of Life Sciences, King's College London, UK, for their assistance.

References

- Crompton, D.W.T. (1985) Reproduction. pp. 213–272 in Crompton, D.W.T. & Nickol, B.B., (Eds) *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge, Cambridge University Press.
- George, P.V. & Nadakal, A.M. (1973) Studies on the life cycle of *Pallisentis nagpurensis* Bhalerao, 1931 (Pallisentidae: Acanthocephala) parasitic in the fish, *Ophiocephalus striatus* Bloch. *Hydrobiologia* 42, 31–43.
- Marchand, B. (1984a) The elaboration of the acanthor shell of *Acanthosentis acanthuri* (Acanthocephala). *Journal of Parasitology* 75, 712–718.
- Marchand, B. (1984b) A comparative ultrastructural study of the shell surrounding the mature acanthor larvae of 13 acanthocephalan species. *Journal of Parasitology* 70, 886–901.
- Peter, W., Taraschewski, H. & Latka, I. (1991) Comparative investigations of the morphology and chemical composition of the eggshells of Acanthocephala: I. *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Archiacanthocephala). *Parasitology Research* 77, 542–549.
- Rai, P. (1967) On four acanthocephalan parasites in freshwater fishes with description of three new species. *Indian Journal of Helminthology* 19, 27–44.
- Stranack, F.R. (1972) The fine structure of the acanthor shell of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Parasitology* 64, 187–190.
- Taraschewski, H. & Peter, W. (1992) Comparative investigations of the morphology and chemical composition of the eggshells of Acanthocephala: II. Palaeacanthocephala. *Parasitology Research* 78, 376–381.
- Taraschewski, H., Peter, W. & Latka, I. (1992) Comparative investigations of the morphology and chemical composition of the eggshells of Acanthocephala: III. Eoacanthocephala. *Parasitology Research* 78, 382–387.
- West, A.J. (1964) The acanthor membranes of two species of Acanthocephala. *Journal of Parasitology* 50, 731–734.
- Whitfield, P.J. (1973) The egg envelopes of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *Parasitology* 66, 387–403.
- Wongkham, W. (1982) *The life cycle of thorny head worm, Pallisentis sp. Vanclave 1928 in serpent head fish Ophiocephalus striatus (Bloch)*. MSc thesis, Chiang Mai University.
- Wongkham, W. (1998) *The biology and host/parasite interactions of Pallisentis sp. (Acanthocephala) from Chiang Mai, Thailand*. PhD thesis, University of London.
- Wongkham, W. & Whitfield, P.J. (1999) *Pallisentis rexus* n. sp. (Eoacanthocephala: Quadrigyridae) from snake-head fish, *Channa striata* Bloch, from the Chiang Mai Basin, Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science* 32, 241–251.
- Wright, R.D. (1971) The egg envelopes of *Mouilliformis dubius*. *Journal of Parasitology* 57, 122–131.

(Accepted 22 May 2003)

© CAB International, 2004

Anthelmintic and antitumor activities of the crude extracts of some species from the two plant families, Annonaceae and Rubiaceae, from Thailand.

Weerah Wongkham^{a,*}, Ann Bartlett^b, Arayar Jatisatien^a,
Prasert Sobhon^c, Phil J. Whitfield^b.

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Huay-Kaew Road, Chiang Mai 50200, THAILAND.

^bDepartment of Biochemistry, King's College London, University of London, 57 Waterloo Road, London SE1 8WA, UNITED KINGDOM.

^cDepartment of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, RamaVI Road, Bangkok 10400, THAILAND.

Abstract

Preliminary screening for the anthelmintic and antitumor activities of the bioactive compound were evaluated *in vitro* on the ethnomedicinal plants from the two families, Annonaceae and Rubiaceae, collected from Chiang Mai province, Northern Thailand. Thirty extracts from different parts of 15 plant species were retrieved by ethanol or distilled water. Two kinds of worms and three human and animal cell lines were used for the bioassay including, *Caenorhabditis elegans* (free living nematode), the cercaria of *Schistosoma mansoni* (human blood fluke), MCF-7 (human breast cancer cell line), HeLa (human cervical carcinoma cell line) and M44 (normal mouse embryonic cells). There are 17 extracts, mostly from annonaceous plants, exhibited the better anthelmintic activity than the commercial standard compound, praziquantel. Of those extracts, 3 showed highly promising activity with excellent selectivity against the worms, the ethanol extracts from young fruit and leaves of *Annona reticulata* and ethanol extract from the young fruit of *Annona squamosa*. The antitumor activity was observed in the 3 extracts from the two plant species, *A. reticulata* and *A. squamosa*, better than the ellipticine. Annonaceous acetogenins are thought to be the natural compounds expressing the anthelmintic and antitumor activities in this study. There was no previous report indicating the active acetogenin from young fruit of annonaceous plant. The ethanol extracts from the leaves of *Ixora lobbii* and the stem of *Paederia foetida*, showed signs of a very good anti-nematode with highly selective activity against *C. elegans*. All of the extracts from the rubiaceae plants exhibited no activity against the cancer cells.

1. Introduction

Several species of the two plant families, Annonaceae and Rubiaceae, have been reported to be used as Antitumor and antiparasites for decades by traditional medical practitioners (Wutthi-Dramawetch, 1977, Tanamatayarat, 2002). Annonaceous plant is a large group of the old world plant family and has been reported distributed in Thailand with more than forty genera with almost two hundred species (Chalearmkrin, 2000). The phytochemistry of the plant has been enormously studied with several major reviews by the group of Professor Jerry L. McLaughlin in the U.S.A. since 1990. Alkaloid and non-alkaloid natural bioactive compounds have been identified from different parts of the plants (Rupprecht et al., 1990, Fang et al., 1993, Gu et al., 1995; Zeng et al., 1996 and Alali et al., 1999) and has been revised on structure and activities recently (Kim, 2002). The compounds have been proven to be with several activities; antibacterial, antiparasitic, pesticidal, antiperkinsonian and antitumor activities. Acetogenins, a large group of the C35/C37 natural compounds was mainly found in the plants with the powerful antitumor and pesticidal activities (Rupprecht et al., 1990; He et al., 1997; Alali et al., 1999). There was a report of antimalarial activity of the extracts from *Annona senegalensis* (Ajaiyeoba et al., 2006). These natural bioactive compounds have been expected to be a

new chemotypes for commercialized antitumor and pesticidal agents. Recent activity testing from the crude extracts of some annonaceous plants reported by Kamuhabwa et al. (2000) expressed the cytotoxic activities to several cancer cell lines.

The Rubiaceae was identified and reported by Maxwell (2001) with forty-one genera and ninety-two species from the Doi Suthep-Pui National Park, Northern Thailand. The ethanol crude extracts from some of those plants expressed the cytotoxic activity to the breast cancer cells (MCF-7) and the cervix carcinoma cells (KB-3-1) (Tanamatayarat, 2002). Several studies has been done on the plant from Rubiaceae for the cytotoxic activity on cancer cells *in vitro*: *Hedyotis corymbosa* and *Hedyotis diffusa* on hepatoma cells (Hep-2B) (Hsu, 1998; Liu, 1995); *Ixora coccinea* on Dalton's lymphoma (DLA), ascites carcinoma (EAC), sarcoma (S-180), lymphoblastic leukemia (ALL), chronic myelogenous leukemia (CML) and K-562 cells (Latha and Panikka, 1998); *Cinchona pubescens* on nasopharynx carcinoma (KB) (Raffauf et al., 1978); *Crossopteryx febrifuga*, *Pavetta crassipes* and *Spermacoce dilorachiata* on colon carcinoma cells (Co1-15) (Chapuis et al., 1988); *Psychotria forsteriana* on rat hepatoma cells (Roth et al., 1986); and *Nauclea orientalis* on human bladder carcinoma (T-24) (Erdemeier et al., 1992).

The anthelmintic activity from natural products has been reported from a few plant species. Anti-nematodes activity from the seed of *Butea frondosa* (Leguminosae) on *Ascaridia galli* has been reported with the inhibition of glucose uptake mechanism (Kumar et al., 1995). The ethanol and aqueous extracts from leaves of *Sencio nudicaulis* (Compositae) expressed antifilarial activity when tested against *Setaria cervi* (Nematoda) with the IC₅₀ at 10 -15 ng/ml respectively (Singh et al., 1996).

Among the above mentioned articles and reviews, none of which has been reported the effect of the lead compounds from the two plant families to be used as the anti-schistosome cercaria, anti-nematode, and the selective cytotoxic effect to cancer cells. Most of the anthelmintic drug not only kills the parasite, but also exhibits the side effects to host cells (Balbaa and Bassiouny, 2006; Hrcakova et al., 2006; Ramirez et al., 2001; Menendez et al., 2001). The schistosome cercaria was chosen as a screening helminthic model in this study for three reasons; schistosomiasis still a serious problem in some part of the world (Blas et al., 2006), the cercaria infective stage is the target to control by prevention of infection and the availability of the parasite in laboratory. On the other hand, the adult stage of Schistosome was difficult to be eradicated by chemotherapy such as praziquantel (Sabah et al., 1986). The selective effect of a lead compound to the target organism, tissue or cells is primary awareness of screening assay for a new drug (Stewart and Stolman, 1961; Lee and Houghton, 2005). Furthermore, there were several signs of the drug resistance developing, especially to praziquantel, on the schistosome (Fallon and Doenhoff, 1994; Ismail et al., 1999; Liang et al., 2000; Liang et al., 2001; Doenhoff et al., 2002). Only two drugs namely praziquantel and triclabendazole are effectively used in the control of trematodiasis (Keiser et al., 2006). Oxamniquine is may be another available alternative to praziquantel (Cioli, 2000). The new bioactive compound would be urgently needed in the near future to control schistosomiasis over the world (Doenhoff et al., 2000; Doenhoff and Pica-Mattocchia, 2006). This research aims to screen the cytotoxic and anthelmintic activities of the crude extracts from some plants in the two families, Annonaceae and Rubiaceae, available from Northern Thailand.

2. Materials and methods

The plants

Different parts of 15 plant species in 2 families, Annonaceae and Rubiaceae, were collected from several areas in the Chiang Mai Basin. The plants were identified by Ms. Angkhana Inta and Dr. Pranee Palee, and the herbarium samples were deposited to the Ethnobotanical Research Section, and the Human and Animal Cell Technology Laboratory collection, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University (Table1). Crude extracts were prepared from the oven-dry plants (47-50°C) in 95% ethanol or distilled water using sonicator. The crudes were concentrated by rotary

evaporator and lyophilized to get the dry or sticky materials and kept in a freezer at -20°C prior to use. Each of the crude was weighted and diluted by ethanol or distilled water as appropriate to get at least 6 serial dilutions to be used in the bioassay.

The animal models and the bioassay for the anthelmintic compound

Anti-nematode assay was performed on the culture of the free living nematode, *Caenorhabditis elegans*. The worm (density of 20-25 worm/ml) was exposed to the crude dilutions on the 24-well plates for 3 hours. The dead worms were distinguished from the quiescent alive, while observation was made under microscopy, with two techniques; the light touch and the mechanic stimulation. The light touch was performed by 2-3 flashing of a 60Watts day-light bulb at a distance of 8-10 centimetres from the observed cultured dish. The mechanic stimulation was the 2-3 times of gently banging by a pen on the dish.

Anti-schistosome assay was carried out on a Puerto Rican strain of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using the infective cercarial stage. The suspension was prepared to get the number of 18-25 cercaria per a milli-litre of the freshly prepared aquarium water. The assay was performed by adding 0.1 ml of the extract on to 0.9 ml of suspension per well in a 24-well cultured plate.

The cell lines

The three cell lines were employed in this research: the cervical carcinoma cells (HeLa) and the breast cancer cell line (MCF-7) kindly provided by Dr. Pornthipa Ticha, the National Cancer Institute, Bangkok and the mouse embryonic fibroblast, M44, developed in the human and animal cell technology laboratory, Faculty of Science, Chiang Mai University. The M44 is a mortal cell lines established by the primary explant from the 10 days old prenatal laboratory mouse embryo, from the Animal Laboratory House, Faculty of Science, Chiang Mai University. The cells on passage 3 after the primary cells were cryopreserved in the liquid nitrogen prior to use. After thawing, the cells were subcultured until passage 8 and used in the crude extracts bioassay mentioned above. The density of each cell line has been prepared for the cytotoxic assay in 96-well plates at 5×10^3 cell/well on a triplicate basis for each concentration of the crude extracts.

SRB assay

The SRB assay was performed using a modified method from that previously described by Lin et al. (1999) and Papazisis et al. (1997). Briefly, 70 μl 0.4% (w/v) sulforhodamine B (Sigma) in 1% acetic acid solution were added to each well of previously prepared 96 well plates (described above) and left at room temperature for 20 min. SRB was removed and the plates washed 5 times with 1% acetic acid before air drying. Bound SRB was solubilized with 200 μl 10mM unbuffered Tris-base solution (Sigma) and plates were left on a plate shaker for at least 10 min. Absorbance was read in a 96-well plate reader (Anthos-2001, Anthos labteck) at 492 nm subtracting the background measurement at 620 nm. The test optical density (OD) value was defined as the absorbance of each individual well, minus the blank value ('blank' is the mean optical density of the background control wells, n=3). The signal-to-noise (S/N) ratio was the product of the following equation: $S/N = (\text{mean test OD} + \text{blank})/\text{blank}$.

Analysis of the effective concentration and the selective index

The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of the crude extracts to the nematode, the cercaria and the cells were determined by the Probit analysis program version 1.63 (Sakuma, 1998).

The selective index (SI) indicates the efficiency of the pharmacotherapeutic activities of the bioactive compounds to human and animal. This index provides a clear evaluation of any valuable lead compounds in the light of their ability to kill the parasite or eliminate cancer cells but exert little damage to normal cells. In this research, the SI was evaluated by considering the ratio of the IC_{50}

between the target organism or cells to the M44. The criteria of the SI has been proposed previously by Atindehou, *et al.* (2004) and has been adapted in this research. The provisional good activity (or highly selective) of the extracts is the <1 value of the ratio. The index has been considered also between the two cancer cell lines to estimate the selectivity of the lead compounds among the different targeted cells.

3. Results

Seventeen out of 30 extracts were found effectively kill the nematode, *C. elegans*, with IC_{50} range 5.2-316.5 $\mu\text{g/ml}$ in 3 hr (Table 2). The extracts has been classified with extremely high, highly, moderately and no activity, with the IC_{50} value of ≤ 1 , $>1-20$, $>20-100$ and >100 $\mu\text{g/ml}$ respectively. To avoid anarchy in the Table 2, the values of IC_{50} greater than 100 $\mu\text{g/ml}$ to the worm or cells were marked on to 5 categories indicated by *. The extracts having no activity to the worms were not being trial in some cases with the cancer cells but with the normal cell line, M44.

Considering the activities of the extracts to the worms, the extracts from Annonaceae, *A. reticulata*, *A. squamosa* and *A. odoratissima* expressed the more tendency of highly selective to kill *C. elegans* than *S. mansoni*. The ethanol extract from the young fruit of the *A. reticulata* and *A. squamosa* exhibited the extremely high activity to *S. mansoni* cercaria with the IC_{50} of 0.4 and 1.1 $\mu\text{g/ml}$ respectively. This extracts expressed considerably higher activity than the praziquantel, which was being categorized with very low (or without) activities with IC_{50} of 425.8 and 156.7 $\mu\text{g/ml}$ to *C. elegans* and *S. mansoni* respectively. However, most of the extracts from different parts of the above mentioned three plants expressed more effective (less IC_{50}) to kill the worms than praziquantel. The most highly effective activities were the ethanol extracts from the young fruit of *A. reticulata* and *A. squamosa*, with the IC_{50} 12.4 and 14.1 $\mu\text{g/ml}$ for *C. elegans* respectively. The extracts from the other annoaceous plants, *A. muricata* and *A. siamensis*, did not indicated such of any result as mentioned with the above three plant species. The two Rubiaceae species, *I. lobbii* (ethanol extract from leaves) and *P. foetida* exhibited the highly selective activities of killing *C. elegans* to *S. mansoni* considering from the ratio of the IC_{50} , 11.0 and 27.2 $\mu\text{g/ml}$ to $>5,000$ $\mu\text{g/ml}$ respectively. The pharmacotherapeutic tendencies of the extracts being classified as active and very highly selective of the worms to those of the M44. The exposed-cercaria to the extracts from young fruit of *A. reticulata* and *A. squamosa* exhibited tail lost and external skin bubbles.

The criterion of antitumor activity for the crude extracts used in this study is adopted as proposed by Tanamatayarat (2000). MCF-7 was effected by the extracts from the *Annona* species with IC_{50} ranging 23.6-269.9 $\mu\text{g/ml}$ and with 4.3-283.9 $\mu\text{g/ml}$ to the HeLa cells. Most of the extracts expressed no activities to the M44 with the IC_{50} >500 $\mu\text{g/ml}$. The extracts from *A. reticulata*, *A. squamosa*, *A. odoratissima* and *I. lobbii* exhibited different degrees of selectivities between the two cancer cell lines. With great difference of the IC_{50} values between the cancer cell lines and those of the M44 (i.e. SI <1), all of the extracts from *A. reticulata*, *A. squamosa*, *A. odoratissima* and *I. lobbii* were considered with highly pharmacotherapeutic tendencies. This means that most of the extracts were more selective to inhibit the cancer cells than the normal cells, in contrasted to the SI from ellipticine.

There is no regular pattern of the activities of the extracts using different solvents from the same plant species, considering on the worms and the cancer cell lines. The ethanol extracts from *A. reticulata* and *A. squamosa* conveyed better activities than the aqueous extract from the same part of the plants. For example; the ethanol extract from the young fruit of *A. reticulata* IC_{50} 12.4, 1.1, 26.8 and 7.6 $\mu\text{g/ml}$ which expressed better activities than the aqueous extract IC_{50} 86.4, $> 5,000$, 80.2 and 30.9 $\mu\text{g/ml}$ for the *C. elegans*, *S. mansoni*, MCF-7 and HeLa respectively. Also the ethanol extracts from the young fruit of *A. reticulata* is less selective to inhibit *C. elegans* than *S. mansoni* with IC_{50} , 12.4 and 1.1 $\mu\text{g/ml}$ respectively, while the aqueous extracts showed the opposite selectivity with IC_{50} , $>5,000$ and 86.4 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The ethanol extract from the young fruit of *A. squamosa* was

more selected to inhibit MCF-7 than HeLa with IC_{50} 23.6 and 53.8 $\mu\text{g/ml}$ respectively, conversely the ethanol extract from the leaf showed the opposite inhibition with IC_{50} , 39.3 and 4.3 $\mu\text{g/ml}$ respectively. On the other hand, the extracts from the plants with no activity to the worms also showed no activity to the cell lines including; *C. odorata*, *M. fruticosum*, *M. siamensis*, *U. rufa*, *D. chinensis*, *I. ebarbata* and *P. linearis*.

4. Discussion and conclusions

Acetogenin has been reported as the biologically active molecules found in annonaceous plant. The molecules inhibit the Complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) in mitochondria and thus cause a decrease in cellular ATP levels and cell death (Londerhausen et al., 1991; Ahammadsahib et al., 1993; Lewis et al., 1993). Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrested cancer cells and expressed the cytotoxic activity (Yuan et al., 2003). Ethanol leaf extract from *A. muricata* showed higher activity against the MCF-7 with ID_{50} 1.9 $\mu\text{g/ml}$ (Kim et al., 1998) than those from annonaceous plant in this study. Moreover, the methanol, hexane and ethyl acetate extracts of the seed, stem, bark and pericarp of this plant expressed the antiparasitic activity against *E. histolytica*, *N. brasiliensis*, *M. dessetae*, *A. salina*, and several species of *Leishmania* (Bories et al., 1991; Jaramillo et al., 2000; Wang et al., 2002). The extracts with IC_{50} values less than 30 $\mu\text{g/ml}$ to any cancer cells were normally considered active, according to the American National Cancer Institute guidelines (Suffness and Pezzuto, 1990). The extracts from *A. reticulata* and *A. squamosa* in this study expressed the active antitumor activity with high selective index in comparison with the normal cells.

None of the previous works has been report the activities of the extract from the young fruit of the annonaceous plant. In the Thai traditional medicine, dry young fruit of the *A. squamosa* has been reported to be used to eliminate the human head louse (Wutthi-Dramawetch, 1997). The nematode, *C. elegans*, has been reported previously to be inhibited by asimicin, an acetogenin found in *Asimina triloba*, at approximately 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (Johnson et al., 1996). This seems much extremely active as anti-nematode activity in contrast with the extracts from annonaceous plant in this study. More than 300 subgroups of acetogenin from annonaceous plants have been discovered and described with the toxicity assays approached (Rupprecht et al., 1990; Fang et al., 1993; Gu et al., 1995; Zeng et al., 1996; Zafra-Polo et al., 1998; Yazbak et al., 1998 and Chang et al., 1999). However, there are normally more than 40 different acetogenins mixture occurred within an extract from annonaceous plant and may surplus or inhibit the activities of each others (Alali, 1999). There were reports of the activities of acetogenin against several species of insects, parasitic protozoa and pathogenic microbes (Alali et al., 1998; McLaughlin et al., 1997). There was no activity against the worms with the extracts from *A. muricata*, *A. siamensis*, and most of the Rubiaceae in this study. The molluscicidal activity was reported from the extracts of *A. squamosa* (Singh and Singh, 2004) and also from *A. muricata* (dos Santos and Sant'Ana, 2001) with the IC_{50} ranged between 0.97-20.26 ppm. In this research, molluscicidal activity had been investigated with the ethanol extracts from young fruit of *A. squamosa* and *A. reticulata* on *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host to *S. mansoni*. The result indicated that the extracts expressed no activity to the snail with $IC_{50} > 5,000$ $\mu\text{g/ml}$. The activity of the extracts to the snail heart beating also investigated. The significant decreased heart rate was evidenced by the exposed snail to the extract from the young fruit of *A. squamosa* at 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (data not shown).

There were reports of antitumor and cytotoxic activities of the extracts from the flower of *Ixora javanica* and *Ixora coccinea* (Nair and Panikkar, 1990; Latha and Panikkar, 1998). There was no previous report for the nematocidal activity of *Ixora* apart from cytotoxic and antitumor principles (Latha and Panikar, 1998; Wang and Huang, 2005).

Antitumor and cytotoxic activities have been reported from some species of rubiaceous plant. The extracts from flowers of *Ixora javanica* expressed broad activity against the Dalton's lymphoma (DLA) and Ehrlich Ascites tumor cells at IC_{50} 12 and 65 $\mu\text{g/ml}$ respectively (Nair and Panikkar, 1990). This extract exhibited no activity against normal lymphocytes, but selectively against leukemic

lymphocytes and K-562. The positive *in vivo* activities against induced tumors in mice had been observed with topical and orally application, but showed post-treatment toxic effects on the urea nitrogen level (Nair et al., 1991). Antinociceptive activity was reported from the extracts of *Ixora coccinea* (Ratnasooriya et al., 2005).

Antidiarrhoeal and anti-inflammatory activity was reported from the ethanol extract of *P. foetida* (Afroz et al., 2006; De et al., 1994), but neither antibacterial nor antifungal activity reported (Pedersen et al., 1999; Cavin et al., 1999). There were several interested activities reported from the other rubiaceous plant in the same genus. The extracts from *Paederia scandans* exhibited a clear inhibition of the Epstein-Barr virus early antigen induction (Kapadia et al., 1996). These activities were studied in laboratory animal model, which are far more out of scope from this study.

Acknowledgements

We would like to express our gratefulness for the kind help with this research to the institutes in Thailand including: the National Cancer Institute, Bangkok; Department of Biology, Faculty of Science, CMU; Faculty of Science, MU; and the institutes in the United Kingdom: Infection and immunity research unit, School of Biomedical Science, King's College London, University of London and FRAM Alternatives Laboratories, School of Biomedical Sciences, University of Nottingham. This work was supported in full by the Thailand Research Fund, grant number MRG4580016.

References

- Afroz, S., Alamgir, M., Khan, M.T.H., Jabbar, S., Nahar, N., Choudhuri, M.S.K., 2006. Antidiarrhoeal activity of the ethanol extract of *Paederia foetida* Linn. (Rubiaceae). *Journal of Ethanopharmacology* 105, 125-130.
- Ajaiyeoba, E., Falade, M., Ogbale, O., Okpako, L., and Akinboye, D., 2006. In vivo antimalarial and cytotoxic properties of *Annona senegalensis* extract. *African Journal, Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 3(1), 137-141.
- Ahammadsahib, K.I., Hollingworth, R.M., McGovern, J.P., Hui, Y.H., McLaughlin, J.L., 1993. Inhibition of NADH:ubiquinone reductase (mitochondrial complex I) by bullatacin, a potent antitumor and pesticidal Annonaceous acetogenin. *Life Science* 53, 1113-1120.
- Alali, F.Q., Kaakeh, W., Bennett, G.W., McLaughlin, J.L., 1998. Annonaceous acetogenins as natural pesticides: potent toxicity against insecticide-susceptible and resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* 91, 641-649.
- Alali, F.Q., Liu, X., and McLaughlin, J.L., 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products* 62(3), 504-540.
- Atindehou, K.K., Schmid, C., Burn, R., Kone, M.W., Traore, D., 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Cote d' Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 221-227.
- Balboa, M. and Bassiouny, K., 2006. *In vitro* effect of schistosomicidal drugs on hepatic arylsulfatase B from the schistosoma-infected mouse. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 21(1), 81-85.
- Blas, B.L., Lipayon, I.L., Tormis, L.C., Portillo, L.A., Hayashi, M., and Matsuda, H., 2006. An attempt to study the economic loss arising from *Schistosoma japonicum* infection and the benefits derived from treatment. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 3(1), 26-32.
- Bories, C., Loiseau, P., Cortes, D., Myint, S.H., Hocquemiller, R., Gayral, P., Cave, A., and Laurens, A., 1991. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. *Planta Medica* 57(5), 434-436.
- Cavin, A., Dyatmyko, W., and Hostettmann, K., 1999. Screening of Indonesian plants for antifungal and free radical scavenging activities. *Pharmaceutical Biology* 37(4), 260-268.

- Chang, F., Chen, J., Lin, C., Chiu, H., Wu, M., and Wu, Y., 1999. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. *Phytochemistry* 51, 883-889.
- Chapuis, C.J., Sordat, B., and Hostettmann, K., 1988. Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 23(2-3), 273-284.
- Cioli, D., 2000. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives?. *Current Option in Infectious Diseases* 13(6), 659-663.
- Cioli, D., Botros, S.S., Wheatcroft-Francklow, K., Mbaye, A., Southgate, V., Tchunte, L.A., Pica-Mattocchia, L., Troiani, A.R., El-Din, S.H., Sabra, A.N., Albin, J., Engels, D., Doenhoff, M.J., 2004. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *International Journal for Parasitology* 34(8), 979-987.
- De, S., Ravishankar, B., and Bhavsar, G.C., 1994. Investigation of the anti inflammatory effects of *Paederia foetida*. *Journal of Ethnopharmacology* 43, 31-38.
- Doenhoff, M.J., Kimani, G., and Cioli, D., 2000. Praziquantel and control of Schistosomiasis. *Parasitology Today* 16(9), 364-366.
- Doenhoff, M.J., Kusel, J.R., Coles, G.C. and Cioli, D., 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96(5), 465-469.
- Doenhoff, M.J., and Pica-Mattocchia, L., 2006. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 4(2), 199-210.
- dos Santos, A.F. and Sant'Ana, A.E.G., 2001. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine* 8(2), 115-120.
- Erdelmeier, A.C., Regenass, U., Rali, T., and Sticher, O., 1992. Indole alkaloids with in vitro antiproliferative activity from the ammoniacal extract of *nauclea orientalis*. *Planta Medica* 58(1), 43-48.
- Fallon, P.G. and Doenhoff, M.J., 1994. Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 83-89.
- He, K., Zhao, G-X., Shi, G., Zeng, L., Chao, J-F., and McLaughlin, J.L., 1997. Additional bioactive Annonaceous acetogenins from *Asimina triloba* (Annonaceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 5(3), 501-506.
- Hrckova, G., Velebny, S., Daxnerova, Z., and Solar, P., 2006. Praziquantel and liposomized glucan-treatment modulated liver fibrogenesis and mastocytosis in mice infected with *Mesocestoides vogae* (M. corti, Cestoda) tetrathyridia. *Parasitology* 132(Pt4), 581-594.
- Hsu, Y.H., 1998. Tumor inhibition by several compounds extracted from *Hedyotis corymbosa* and *Hedyotis diffusa*. *Cancer Detection and Prevention* 22(Suppl 1), S5-S56.
- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L.F., Day, T.A., and Bennett, J.L., 1999. Resistance to praziquantel: Direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60(6), 932-935.
- Jaramillo, M.C., Arango, G.J., Gonzalez, M.C., Robledo, S.M., and Velez, I.D., 2000. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia* 71(2):183-186.
- Johnson, H.A., Gordon, J., and McLaughlin, J.L., 1996. Monthly variations in biological activity of *Asimina triloba*. In: J. Janick (Ed.), *Progress in new crops*, ASHS Press, Arlington, VA. pp 609-614.
- Kamuhabwa, A., Nshimo, C., and de Witte, P., 2000. Cytotoxic of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 143-149.

- Kapadia, G.J., Sharma, S.C., Tokuda, H., Nishino, H., and Ueda, S., 1996. Inhibition effect of iridoids on Epstein-Barr virus activation by a short-term in vitro assay for anti-tumor promoters. *Cancer Letters* 102, 223-226.
- Keiser, J., Brun, R., Fried, B., and Utzinger, J., 2006. Trematocidal activity of praziquantel and artemisinin derivatives: In vitro and in vivo investigations with adult *Echinostoma caproni*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 50(2), 803-805.
- Kim, G.S., Zheng, L., Alali, F., Rogers, L.L., Wu., F.E., McLaughlin, J.L., and Sastrodihardjo, S., 1998. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Product* 61(4), 432-436.
- Kim, J., and Park, E.J., 2002. Cytotoxic anticancer candidates from natural resources. *Current Medicinal Chemistry – Anti-cancer Agents* 2(4), 485-537.
- Kumar, D., Mishra, S.K., Tandan, S.K., and Tripathi, H.C., 1995. Possible mechanism of anthelmintic action of palasonin on *Ascaridia galli*. *Indian Journal of Pharmacology* 27, 161-168.
- Latha, P.G. and Panikkar, K.R., 1998. Cytotoxic and antitumor principles from *Ixora coccinea* flowers. *Cancer Letters* 130(1-2), 197-202.
- Lee, C.C. and Houghton, P., 2005. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 237-243.
- Lewis, M.A., Arnason, J.T., Philogene, J.R., Rupprecht, J.K., and McLaughlin, J.L., 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the paw paw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 45, 15-23.
- Liang, Y.S., Coles, G.C., and Doenhoff, M.J., 2000. Detection of praziquantel resistance in schistosomes. *Tropical Medicine and International Health* 5(1), 72.
- Liang, Y.S., Coles, G.C., Doenhoff, M.J. and Southgate, V.R., 2001. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *International Journal for Parasitology* 31, 1227-1235.
- Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 49, 57-68.
- Londerhausen, M., Liecht, W., Leib, F., and Moeschler, H., 1991. Molecular mode of action of annonins. *Pesticide Science* 33, 427-438.
- Maxwell, J.F., 2001. Annotated enumeration of the vascular plants of Doi Suthep-Pui National Park. In: J.F. Maxwell and S. Elliott (Eds.), *Vegetation and Vascular Flora of Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai Province, Thailand*. Thai Studies in Biodiversity 5, Biodiversity Research and Training Programme, Bangkok, pp. 90-93.
- McLaughlin, J.L., Zeng, L., Oberlies, N.H., Alfonso, D., Johnson, H.A., and Cummings, B.A., 1997. Annonaceous acetogenins as new natural pesticides : recent progress. In: P.A. Hedin, R.M. Hollingworth, J. Miyamoto, D.G. Thompson (Eds), *Phytochemicals for pest control*, Symp. Ser. 658, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 117-133.
- Nair, S.C. and Panikkar, K.R., 1990. Antitumor principles from *Ixora javanica*. *Cancer Letters* 49(2), 121-126.
- Nair, S.C., Panikkar, B., Akamanchi, K.G., and Panikkar, K.R., 1991. Inhibitory effects of *Ixora javanica* extract on skin chemical carcinogenesis in mice and its antitumor activity. *Cancer Letters* 60(3), 253-258.
- Papazisis, K.T., Geromichalos, G.D., Dimitriadis, K.A., and Kortsaris, A.H., 1997. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, 208, 151-158.
- Pedersen, O., Gurib-Fakim, A., Hussein, S., and Adsersen, A., 1999. Pharmacological properties of seven medicinal plants of the Rubiaceae from Mauritius. *Pharmaceutical Biology* 37(3), 202-207.
- Raffauf, R.F., Le Quesne, P.W., and Ghosh, P.C., 1978. Antitumor plants. V. Constituents of *Cinchona pubescens*. *Lloydia* 41(5), 432-434.

- Roth, A., Kuballa, B., Bounthan, C., Cabalion, P., Sevenet, T., Beck, J.P., and Anton, R., 1986. Cytotoxic Activity of polyindoline alkaloids of *Psychotria forsteriana* (Rubiaceae) (1) . *Planta Medica*, 6 : 450-453.
- Ratnasooriya, W.D., Deraniyagala, S.A., Gathige, S.D.N.K., Goonasekara, C.L., and Jayakody, J.R.A.C., 2005. Antinociceptive action of aqueous extract of the leaves of *Ixora coccinea*. *Acta Biologica Hungarica* 56 (1-2), 21-34.
- Rupprecht, J.K., Hui, Y-H., and McLaughlin, J.L., 1990. Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products* 53(2), 237-278.
- Sabah, A.A., Fletcher, C., Webbe, G., and Doenhoff, M.J., 1986. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Experimental Parasitology* 61(3), 294-303.
- Sakuma, M., 1998. Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology* 33, 339-347.
- Sing, R., Khan, N.U., and Singhall, K.C., 1996. *In vitro* antifilarial activity of *Sencio nudicaulis* Buch.Ham. effect on *Setaria cervi* (Nematoda : Filarioidea). *Indian Journal of Physiological Pharmacology* 40, 231-236.
- Singh, A., and Singh, D.K., 2004. Effect of herbal molluscicides and their combinations on the reproduction of the snail *Lymnaea acuminata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(4), 470-477.
- Suffness, M., and Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: K. Hostettmann (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity* vol. 6, Academic Press, London, pp. 71-133.
- Thiengburanadrama, W., 1999. *Dictionary of the Thai ethnomedicinal plant*. 5th Ed., Ruom-Sarn (1997) Co. Ltd., Bangkok. (Publish in Thai). 880p.
- Wang, L.Q., Min, B.S., Li, Y., Nakamura, N., Qin, G.W., Li, C.J., and Hattori, M., 2002. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10(3), 561-565.
- Wang, Y-C and Huang, T-L., 2005. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43, 295-300.
- Wutthi-Dramawetch, W., 1977. *The encyclopedia of medicinal plants of Thailand : The Thai Pharmaco-Ethnobotany*. The Odian Store Publishing Co., Ltd., Bangkok. (Publish in Thai). pp. 630.
- Yazbak, A., Sinha, S.C. and Keinan, E., 1998. Total synthesis of Uvaricin. *Journal of Organic Chemistry* 63, 5863-5868.
- Zafra-Polo, M.C., Figadère, B., Gallardo, T., Tormo, J.R. and Cortes, D., 1998. Natural acetogenin from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry* 48(7), 1087- 1117.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

Table 1
The plant species from the two families; Annonaceae and Rubiaceae (separated by double lines). Abbreviation; B-bark, L-leaf, Sd-seed, St-stem and YF-young fruit. The therapeutic activities were translated from Wutthi-Dramawetch (1977), n/r – no record available.

Plant species	Voucher no.	Therapeutic activity
<i>Annona squamosa</i>	CMU 027161	anti-skin ectoparasite
<i>Annona muricata</i>	CMU-AL 017	n/r
<i>Annona reticulata</i>	CMU-AL 013	anthelmintic activity
<i>Artabotrys siamensis</i>	CMU 027155	n/r
<i>Artabotrys odoratissimus</i>	CMU-AL 012	n/r
<i>Cananga odorata</i>	CMU 027156	Diuretic
<i>Melodorum fruticosum</i>	CMU-AL 015	anti- heart failure
<i>Melodorum siamensis</i>	CMU 027154	n/r
<i>Uvaria rufa</i>	CMU-AL 014	n/r
<i>Desmos chinensis</i>	CMU 027157	n/r
<i>Ixora ebarbata</i>	CMU-AL 011	anti-parasite
<i>Ixora lobbii</i>	CMU 027160	anti-inflammation
<i>Paederia linearis</i>	CMU 027158	anti-ascariasis
<i>Paederia foetida</i>	CMU-AL 016	anti-ascariasis
<i>Kopsia fruticosa</i>	CMU 027159	n/r

Table 2
The IC₅₀ of anti-nematode, anti-schistosome cercaria, and cytotoxicity of the plant extracts. The effective amount of the extract are all shown in µg/ml. Abbreviation for the parts of extracted plants: B-bark, L-leaf, Sd-seed, St-stem and YF-young fruit; and the solvent: E-ethanol, W-water (aqueous). The double lines separated between Annonaceae, Rubiaceae and standard drugs.

plant species	part	solvent	<i>C. elegans</i>	<i>S. mansoni</i>	MCF-7	Hela	M44
<i>A. muricata</i>	L	E	*****	*****	*****	NE	*****
	YF	E	12.4	1.1	26.8	7.6	***
	YF	W	86.4	**	80.2	30.9	****
	Sd	W	*(164.2)	**	*(269.9)	*(126.6)	****
<i>A. reticulata</i>	L	E	5.2	35.7	8.8	25.8	***
	L	W	17.3	***	25.3	*(103.6)	****
	B	E	17.0	**	43.3	84.8	****
	B	W	25.0	****	*(135.8)	*(283.9)	***
<i>A. siamensis</i>	L	E	*****	*****	NE	NE	*****
	YF	E	14.1	0.4	23.6	53.8	***
<i>A. squamosa</i>	L	E	*(193.2)	**	39.3	4.3	****
	L	W	*(198.4)	****	NE	NE	NE
	YF	E	81.1	***	*(170.1)	*(106.0)	**
	YF	W	49.0	***	*(274.6)	*(161.9)	**
<i>A. odoratissimus</i>	L	E	*(135.2)	***	NE	NE	***
	L	W	72.1	**	86.7	93.0	**
	B	E	****	****	NE	NE	****
<i>C. odorata</i>	L	E	*****	*****	*****	NE	*****
<i>M. fruticosum</i>	L	E	*****	*****	NE	NE	*****
<i>M. siamensis</i>	L	E	*****	*****	*****	NE	*****
<i>U. rufa</i>	L	E	*****	*****	NE	NE	NE
	B	E	*****	*****	*****	NE	*****
<i>D. chinensis</i>	L	E	****	*****	NE	NE	NE
<i>I. ebarbata</i>	L	E	****	****	*****	*****	*****
<i>I. lobbii</i>	L	E	11.0	**	*(107.5)	*(194.6)	****
<i>P. linearis</i>	L	E	*****	*****	*****	*****	*****
	St	E	***	*****	*****	*****	NE
<i>P. foetida</i>	L	E	*****	*****	*****	*****	*****
	St	E	27.2	**	*****	*****	*****
<i>K. fruticosa</i>	L	E	*(316.5)	*****	*****	*****	*****
Praziquantel	SIGMA P4668	E	*(425.8)	*(156.7)	**	***	***
Ellipticine	SIGMA E3380	DMSO	NE	NE	18.7	12.3	39.5

Asterisk(s) – no activity with the different degree range of IC₅₀ : * = 100-500; ** = >500-5,000; *** = >5,000-10,000; **** = >10,000-50,000; and ***** = >50,000 µg/ml.

NE – no experiment taken in this research

Genotoxicity effects and the chromosome aberration of the ethanol crude extracts from annonaceous plants.

Dasa, K.^a; Wongkham, W.^{a,*}; Mevatee, M.^b; Jariyawidhyawat, P.^a,
and Kangwanpong, D.^a

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Huay-Kaew Road, Chiang Mai 50200, THAILAND.

^bDepartment of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Huay-Kaew Road, Chiang Mai 50200, THAILAND.

Abstract

Five species of the annonaceous plants, consisted of *Annona reticulata* (bark, leaves and young fruits), *Annona squamosa* (leaves, and young fruit), *Cananga odorata* (leaves), *Cananga odorata* var. *fruticosa* (leaves) and *Melodorum fruticosum* (leaves), had been extracted by ethanol. The extracts had been screened by the MTT assay for the cytotoxic activities using the desired dividing and non-dividing densities of the two cell lines; human cervical adenocarcinoma (HeLa) and the normal amniocytic cell line (AMC-K46). The highest active extract to the AMC-K46 was from the leaves of *M. fruticosum* with the MTT₅₀ of 10.48 and 439.00 µg/ml for the dividing and non-dividing cells respectively. For HeLa, the highest effect had been identified from the young fruit extract of *A. reticulata* with the MTT₅₀ of 0.86 and 21.0 µg/ml for the dividings and non-dividings respectively. The highly selective effect of the extract from *A. squamosa* (young fruit) to HeLa has also been classified (MTT₅₀ = 5.25 µg/ml). The three extracts, with the highest activity had been chosen for the mutagenesis assay on AMC-K46; *A. reticulata* (young fruit), *A. squamosa* (young fruit) and *M. fruticosum* (leaves). The extracts from *A. reticulata* and *A. squamosa* inhibit the mitotic division of the cells with the mitotic index of 0.75 and 0.93 respectively. These two extracts also exhibit significantly higher percentage of decreasing of mitotic index than that of the controlled cells. The extract from *M. fruticosum* expresses no effect on the mitotic division of the cells. The metaphases with the highest frequency of chromosome (67 and 68) have been chosen as the modal chromosome number. All of the three extracts exhibit non-significant genotoxicity to the cells with the percentage of aberrant metaphase of 0.82, 1.68 and 6.32 for *A. reticulata*, *A. squamosa* and *M. fruticosum* respectively. Four types of chromosomal aberration have been observed in the cells exposing to those extracts *i.e.*, acentric fragment, chromatid break, chromatid deletion and chromatid gap. In conclusion, any usage of these extracts in the indigenous medical treatment should be with great care and precautions, particularly with topical application.

Introduction

Almost 320 secondary natural products, from 150 species belonging to 41 genera of the annonaceous plant, were reviewed from 288 publications by Leboeuf *et al.* (1982). The phytochemistry of the plant has been studied for decades with several major reviews by the group of Professor Jerry L. McLaughlin in U.S.A. since 1990 (Rupprecht *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 1996 and Alali *et al.*, 1999). Alkaloid and non-alkaloid natural bioactive compounds have been identified from different parts of the plants. The compounds have been proven to be with several activities; antibacterial, antiparasitic, pesticidal, antiperkinsonian and antitumor activity. Acetogenins, a large group of the C35/C37 natural compounds was mainly found in the plants with the powerful antitumor and pesticidal activities (Alali *et al.*, 1999). The natural acetogenins from the plants has been expected to be a new chemotypes for commercialized antitumor and pesticidal agents. Recent activity testing from the crude extracts of some annonaceous plants reported by Kamuhabwa *et al.* (2000) expressed the cytotoxic activities to several cancer cell lines. Among the above mentioned articles and reviews, none of which has been reported the effect of the

lead compounds from the plants to the genotoxicity and chromosome aberration in the human or animal cells. This study was initiated with the aims to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity of the ethanol crude extracts from some species of the annonaceous plants against the human cancer and normal cells.

Materials and methods

The plants

Five annonaceous plant species were used in this research; *Annona reticulate* L., *Annona squamosa* L., *Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson var. *odorata*, *Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson var. *fruticosa* (Craib) J. Sinclair and *Melodorum fruticosum* Lour. The plants were identified by Angkhana Inta and the herbarium samples were deposited to the collection of the Human and Animal Cell Technology Research Laboratory, Department of biology, Faculty of Science, Chiang Mai University. Bark, leaves and young fruits of the plants were collected (Table 1) and dried in a hot air oven at 50°C until the stability of the weight was observed. The dried materials were ground to powder and extracted with 80% ethanol overnight. The ethanolic extracts were filtered, evaporated by rotary evaporators and lyophilized. Dried residues were weighed and stored at -20°C until needed. The dried crude was brought to room temperature and weighted at a µg-base before dissolved in DMSO. The crude-DMSO mixture was then diluted in the cell growth medium at a desired package of concentrations prior to used as a freshly crude-working solution (CWS).

The cell lines

Two cell lines were employed; human amniotic fluid cells (AMC-K46) and human cervical adenocarcinoma cells (HeLa). All of the cell lines were used in semiconfluent conditions (exponential phase) and maintained in cryopreservative condition in deep freezer (-80 °C).

AMC-K46: The AMC-K46 was established and developed from normal primary amniocytic cells which obtained by amniocentesis. The cells were cultured in RPMI1640, 10%FBS, 5%CO₂, 37°C, 95%RH and used in the experiments at the 14th to 18th passages.

HeLa cells: The HeLa is a continuous cell lines which kindly provided by Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerak, Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. The cells were cultured in MEM, 10% FBS, 5%CO₂, 37°C, 95%RH.

MTT assay and the cytotoxic evaluation

In this research the cell densities were determined at 2.6×10^4 and 5.2×10^5 cells/cm² for AMC-K46 and 1.3×10^4 and 2.6×10^5 cells/cm² for HeLa for dividing and non-dividing cells respectively. The cells were subcultured and seeded to the 96 well-plate using half plate criteria for dividing and non-dividing cells and incubated for 24 hours. Seven concentrations of CWS were desired as appropriated and each of which was added on a triplicated-base treatments to the plate. The 1% DMSO in the cells growth medium and the cell growth medium, was added to the wells as the solvent control and the medium control, respectively. After the next 24 hours of incubation, all of the solutions were removed gently and 200µl of the freshed growth medium was added into each well. The plate was then carried on for MTT assay following Freshney (2000), as briefly summarized as follow; the 20 µl of MTT dye (10µg/ml) was added to each well and incubated in humidified incubator at 37 °C for 4 hours, removed the medium and the MTT dye from the wells and added 200 µl DMSO to each well (to dissolve the remaining MTT-formazan crystals), incubated for 10 minutes at room temperature. The absorbance at 570 nm was recorded with a reference wavelength of 640 nm by the microplate reader (Anthos 2010). The test optical density (OD) value was defined as the absorbance of each individual well, minus the blank value ('blank' is the mean optical density of the background control wells, n=3). The signal-to-noise (S/N) ratio was the product of the following equation: $S/N = (\text{mean test OD} + \text{blank})/\text{blank}$. The

cytotoxic effect was analysed as MTT_{50} using the Priprobit analysis program version 1.63 (Sakuma, 1998).

Genotoxicity assay and the chromosome aberration

The chromosome aberration was studied only in the AMC-K46. Three of the most highly active crude extracts to the cell lines were chosen to be used in this experiment including: *A. reticulata* (young fruit), *A. squamosa* (young fruit) and *M. fruticosum* (leaves). Cultured dishes (size of 10 cm^2) were each seeded with 1×10^5 cells of AMC-K46. After 24 hours of incubation, the dishes were added triplicately with CWS, or DMSO as solvent controls, or mitomycin C (MMC) $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ as a positive control. After 24 hours of exposure, the chromosome was harvested and the chromosome aberrations was studied following the methods described by Klanginsirikul (2003); briefly, the spreading metaphase chromosome were stained by non-banding technique with 10% Giemsa in Weise phosphate buffer for 10 minutes. The mitotic index (M.I.) was evaluated as the percentage ratio of the metaphase cells in a thousand counted cells. The percentage of decreasing of mitotic index (P-D.M.I.) was the percentage ratio of the decreasing of the M.I. of the treated cells from the control cells to the total number of M.I. of the control cells. The chromosome aberration screening was scored from at least 50 spreading metaphases with the following observation terms: the number of chromosome, the percentage of aberration and the type of aberration observed on chromosome and chromatid (deletion, breaking, interchange, fragment, dicentric and ring chromosome).

Results

The cytotoxicity and selective index

The MTT_{50} was determined and presented in Table 1 for AMC-K46 and HeLa respectively. The criteria of cytotoxicity activity for the crude extracts used in this study is as proposed by Tanamatayarat (2000). Three groups of the extracts has been classified; highly active, moderately active and no activity, with the value of MTT_{50} ; ≤ 20 , $>20-100$ and $>100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ respectively.

To provide a more understanding of the activity of the extracts, the selectivity index has been evaluated and presented in last four columns in Table 1. The criteria of the selectivity index has been proposed previously by Atindehou *et al.* (2004) and has been adapted in this research as the ratio of any two active or non-active MTT_{50} concentrations. In this research, the evaluation of the selectivity index is in three folds; highly selective, moderately selective and non-selective with the values ratio; ≤ 0.29 , $0.3-0.79$ and ≥ 0.8 respectively. This index provides a clear evaluation of any valuable lead compounds in the light of their ability to eliminate cancer cells but exert little damage to normal cells. The provisional good activity (or very highly selective) of the extracts is the <0.1 value of the ratio between dividing and non-dividing cells of the same cell line. The index has been calculated also between the two cell lines to estimate the activity of the lead compounds among the different targeted cells.

For AMC-K46, the most highly active extract was from the leaves of *M. fruticosum* with the MTT_{50} of $10.48\ \mu\text{g}/\text{ml}$ on the dividings, but with $4.39 \times 10^2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ on the non-dividings. This means that the plant has a higher selective activity to kill the mitotic cells (dividing cells) than the resting cells (non-dividing cells) which indicated by the very low value of the selectivity index, 0.024. A moderated activity was detected from the young fruit of *A. squamosa* with almost similar MTT_{50} at 53.70 and 43.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to the dividings and non-dividings respectively. Considering of this extract as a non selective activity between the dividings and non-dividings with the selectivity index >1 ($53.70 / 43.75 = 1.23$). The other extracts are all classified as no activity with the $MTT_{50} >100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ and so have not been considered further in this research.

To the HeLa cells, three extracts showed the highly active effects to the dividings; *A. reticulata* (young fruits), *A. squamosa* (young fruits) and *M. fruticosum* (leaves) with MTT_{50} ; 0.86, 5.25 and 13.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. The other three of the extracts expressed the moderately activity to the dividings; *A. reticulata* (leaves), *A. squamosa* (leaves) and *C. odorata var fruticosa* (leaves) with the MTT_{50} ; 61.59, 82.30 and 74.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. For the non-dividing HeLa, three extracts has been categorized as

the moderately actives, *A. reticulate* (young fruits), *A. reticulate* (leaves) and *A. squamosa* (young fruits) with the MTT₅₀; 21.0, 96.3 and 59.24 µg/ml respectively. The *A. reticulate* (young fruit), *A. squamosa* (young fruit), *C. odorata var fruticosa* (leaves) and the *M. fruticosum* (leaves) expressed the highly selective to kill the dividing cells than the non-dividing cells with the selectivity index < 0.1. The other two extracts expressed moderately to less selectivity index to the dividing cells; *A. reticulate* (leaves) and *A. squamosa* (leaves) with the ratios, 0.640 and 0.814 respectively.

Table 1 The MTT₅₀ and the selective index of the crude extracts to the dividing and non-dividing cells. The selective index of each cell line was calculated by the ratio between the MTT₅₀-dividing / MTT₅₀-non-dividing and those of each cell density was the ratio of MTT₅₀-HeLa / MTT₅₀-AMC-K46 cells. Abbreviation : lv - leaves, sb - stem bark, yf - young fruit and NAc – no activity.

Plant species	MTT ₅₀ µg/ml				selective index			
	AMC-K46 dividing	AMC-K46 non-dividing	HeLa dividing	HeLa non-dividing	AMC-K46	HeLa	dividing	non-dividing
<i>A. reticulate</i> (yf.)	2.99x10 ³	3.76x10 ⁶	0.86	21.0	NAc	0.041	2.8x10 ⁻⁵	5.5x10 ⁻⁶
<i>A. reticulate</i> (lv.)	1.21x10 ²	1.54x10 ³	61.59	96.3	NAc	0.640	0.51	0.063
<i>A. reticulate</i> (sb.)	3.70x10 ²	2.25x10 ³	7.26x10 ⁵	1.73x10 ⁴	NAc	NAc	NAc	NAc
<i>A. squamosa</i> (yf.)	53.70	43.75	5.25	59.24	NAc	0.089	0.098	0.739
<i>A. squamosa</i> (lv.)	1.22x10 ²	2.06x10 ⁴	82.30	1.01x10 ²	NAc	0.815	0.675	NAc
<i>C. odorata</i> (lv.)	1.06x10 ⁴	3.55x10 ⁵	1.01x10 ⁴	1.15x10 ⁷	NAc	NAc	NAc	NAc
<i>C.o. fruticosa</i> (lv.)	3.64x10 ²	1.21x10 ³	74.90	2.86x10 ³	NAc	0.028	0.206	NAc
<i>M. fruticosum</i> (lv.)	10.48	4.39x10 ²	13.90	1.54x10 ²	0.024	0.090	0.754	NAc

The effect of the extract to the AMC-K46 chromosome

The mitotic index

The average mitotic index (M.I.) of the crude extracts from the three plants, *A. reticulate* (young fruit), *A. squamosa* (young fruit) and *M. fruticosum* (leaves) are presented in Table 2. The M.I. of the cells treated with the extracts from *A. reticulate* and *A. squamosa* exhibited (0.75 and 0.93 respectively) with non-significant difference from that of the Mitomycin C (MMC) exposed cells (1.63). This explains that the two plant extracts inhibited the mitotic division of the cells. The extract from *M. fruticosum* exhibited (4.36) the same M.I. (with non-significant difference) to the DMSO exposed cells (4.36) and the control cells (4.84). On considering the percentage of decreasing M.I. (P-D.M.I.), the cells treated with the extracts were 84.6, 80.9 and 10.2 for *A. reticulate*, *A. squamosa* and *M. fruticosum* respectively. The extracts from *A. reticulate* and *A. squamosa* expressed significantly higher anti-proliferative activity than the DMSO exposed cells (P-D.M.I. =10.0). The extracts from the two plants also exhibited a non-significant difference of the P-D.M.I. to the MMC treated cells (P-D.M.I. = 66.3). The extract from *M. fruticosum* exhibited no effect to the cells with the P-D.M.I = 10.2 which is non-significant difference from the DMSO exposed cells (P-D.M.I. =10.0).

The chromosome aberration

The chromosome aberration was screened from 232-345 metaphases and summarized in the Table 3. The percentage of the aberrant metaphase from the cells treated with *A. reticulate*, *A. squamosa* and *M. fruticosum* (0.82, 1.68 and 6.32, respectively) exhibited no significant difference to the DMSO and the medium control group (0.96 and 0.63 respectively). The numerical and structural mutation has been observed. The pattern of numerical changes in the cells after the exposure to the plant extracts showed in Figure 1. The total chromosome counting pattern of all treatment shown the 67 chromosomal

cells still found in the highest frequency. The 68 chromosomal cells were decreased in the DMSO and the plant extract treatment groups. There are 4 types of aberration observed in the cells treated with the crude extracts of the plants, the medium control and the solvent control (DMSO) groups; acentric fragment (ace) chromatid break (ctb), chromatid deletion (ctd) and chromatid gap (ctg) (Figure 2). All the 4 types of aberration were found in the cells treated with *A. reticulata*, while the ctb, and the ctb+ctd in *A. squamosa* and *M. fruticosum* treated cells respectively. The chromosome type of aberration in the extract-treated cells was only found in one metaphase of the *M. fruticosum* group. In addition to the above four types of aberration, the chromosome break (acentric fragment or "ace") and the chromatid exchange (cte) were found in the MMC treated cells (with 59.29%). These aberrations are normally occurred in any animal cells treated with MMC (Klanginsirikul, 2003) and in this study, AMC-K46.

Table 2 The genotoxic of the ethanol extract from *A. reticulata*, *A. squamosa* and *M. fruticosum*. Abbreviation: Ab.met. – number of aberration metaphase, Sc.met.- number of screen metaphase, ace - acentric fragment, ctb - chromatid break, ctd - chromatid deletion and ctg - chromatid gap.

	medium	DMSO	MMC	<i>A. reticulata</i>	<i>A. squamosa</i>	<i>M. fruticosum</i>
M.I. (\pm SD)	4.84(\pm 2.27)	4.36(\pm 0.27)	1.63(\pm 0.08)	0.75(\pm 0.25)	0.93(\pm 0.26)	4.35(\pm 0.68)
P-D.M.I.	-	10.0	66.3	84.6	80.9	10.2
Sc. Met.	322	322	345	232	234	295
Ab. met.	2	2	205	5	2	16
% aberration	0.63	0.63	59.29	0.82	1.68	6.32
Type of observed Aberration	Ctb, ctd	ctb, ctg	ctb, ctg, ctd, ace, cte	ctb, ctg, ctd	ctb	ctb, ctd, ace

Discussion

The crude extract from the 3 plants, *A. reticulata* (young fruit), *A. squamosa* (young fruit) and *M. fruticosum* (leaves), exhibited the effective potent of selectivity to the two cell lines. Acetogenin and kaurane diterpenoids would be the main active agents with highly selective to the two cell lines (Chang, 1993, Wu *et al.*, 1996, Yu *et al.*, 1997, Chang *et al.*, 1998 and Yuan *et al.*, 1998). The other alkaloids or glycosides would also probably be the active agents against the cells (Leboeuf *et al.*, 1982). The young fruit of *A. reticulata* exhibited the highest effect to the cells in all aspects of this study. As far as known to date, this is the first record of the young fruit of the annonaceous plant to be extracted and studied. However, as this was a preliminary screening, further studies with the purification of the active compounds would be of great interest.

Consider on the P.D.M.I., the exposed cells to the crude extracts from *A. reticulata* and *A. squamosa*, which were higher than the unexposed cells (control groups). The acetogenin and liriodinine (topoisomerase II inhibitor) would be the effective compounds to the cells (Woo *et al.*, 1997 and Alali *et al.*, 1999). The cause of slightly increasing of the percentage of the chromosome aberration may be possibly from the genetic instability due to the differentiation of the cells (Walen, 2002). The chromatid type of aberrations observed in all the cells led to the conclusion of the effect to the M phase of cell cycle (Mitchell, 2000).

There was no previous report known to date using the amniotic fluid cell lines in a panel of screening, neither for cytotoxic nor genotoxic agent from natural products. Such the screenings have been done popularly by the "micronucleus assay" using the cells from bone marrow of laboratory animal (Hu *et al.*, 2005; Çelik *et al.*, 2005). 3T3 (the mouse fibroblast cell line) have been used widely as the model for the cytotoxicity testing for the cosmetic product (Chew and Maibach, 2000). AMC-K46 responded to the SDS with the MTT₅₀ (71.3 μ g/ml) very similar to that of 3T3 (70 μ g/ml). This is quite a good tendency of the AMC-K46 (or any other amniotic fluid cell lines) to be used as cytotoxic embryonic human epithelial cell model for the cosmetic or drug screening in the future.

The spontaneous mutation on the amniotic cells has been reported by Walen (2002). The study of mosaicism in the chromosome distribution and aberration requires the advanced technique such as

FISH or SKY (Mitchell, 2000). The MI and P-D.M.I. evaluations as mentioned in this study is the cytogenetical endpoint assay in which the mechanism has been performed for a certain period of time (Major et al., 1994). The longer exposure of the cells to the active compound may be needed in the further experiment with the concerning of cell cycle and average generation time (Henderson et al., 1997). The pharmacogenomics procedures may also be considered as a quantitative gene profiling in the effects of the natural products (Schweifhoffer et al., 2000). The expertise, skill and endurance is seems to be very important for such a task. The study on the chromosome of more than 100 metaphases, one by one, emphasizes the procedures with quite tedious and time consuming.

Conclusion

Five species of the annonaceous plant have been extracted; *Annona reticulata* (bark, leaves, young fruit), *Annona squamosa* (leaves, young fruit), *Cananga odorata* (leaves), *Cananga odorata* var *fruticosa* (leaves) and *Melodorum fruticosum* (leaves). The extracts from young fruit of *A. reticulata* and *A. squamosa* showed the highest and highly cytotoxic effects to the two cell lines, HeLa (human cervical adenocarcinoma) and AMC-K46 (human amniocytic cells) respectively. The highest selective extract to the AMC-K46 was from *M. fruticosum*, but exhibited poorly selective to the dividing and the non-dividing cells. The moderated cytotoxic effect to the cells was from young fruit of *A. squamosa*. The others were identified with no activity to the cells. Three extracts have been chosen to be used to study the genotoxicity assay to the AMC-K46; *A. reticulata* (young fruit), *A. squamosa* (young fruit) and *M. fruticosum* (leaves). The extracts from the young fruit of *A. reticulata* and *A. squamosa* inhibited the mitotic division of the cells. The extract also expressed the highly significant difference of the percentage of decreasing of mitotic index (P-D.M.I.) of the extract exposed cells to those of the unexposed cells. The metaphases with the highest frequency if the chromosome number, 67 have been chosen as the modal number. None of the three extracts showed the significant genotoxicity on the exposed cells to the unexposed cells (control groups). There were 4 types of aberration observed from the extract-exposed cells; acentric fragment, chromatid break, chromatid deletion and chromatid gap.

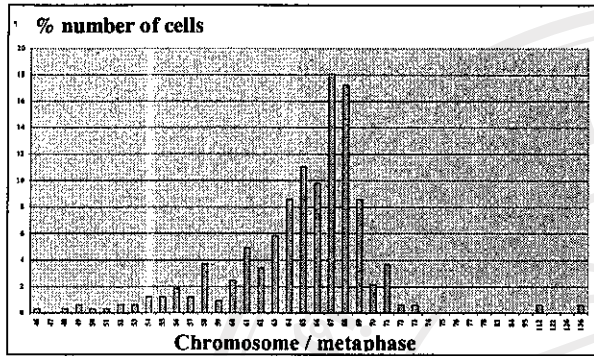
Acknowledgements

We would like to express our gratefulness for the kind assisted to the institutes in the United Kingdom: Infection and immunity research unit, School of Biomedical Science, King's College London, University of London and FRAM Alternatives Laboratories, School of Biomedical Sciences, University of Nottingham. This work was supported in full by the Thailand Research Fund, grant number MRG4580016.

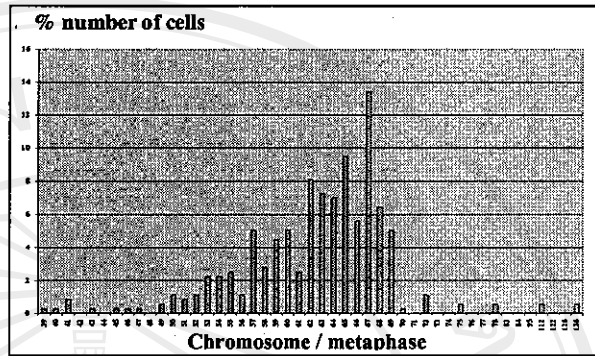
References

- Alali F.Q., Liu X. and McLaughlin J.L., Annonaceous Acetogenins: Recent Progress, *J. Nat. Prod.*, 1999; **62**: 504-540.
- Atindehou K.K., Schmid C., Burn R., Kone M.W., and Traore D., Antitrypanosomal and Antiplasmodial Activity of Medicinal Plants From Cote d' Ivoire, *J. Ethno.*, 2004; **90**: 221-227.
- Çelik A., Mazmanci B., Çamlıca Y., Çömelekoğlu Ü. and Aşkin A., 2005. Evaluation of Cytogenetic Effects of Lambda-Cyhalothrin on Wistar Rat Bone Marrow by Gavage Administration. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*; 2005; **61**: 128-133.
- Chang F.R., Wu Y.C., Duch C.Y. and Wang S.K., Studies on the Acetogenins of Formasan Annonaceous plants. II. Cytotoxic Acetogenins From *Annona reticulata*. *J. Nat Prod.*, 1993; **56**: 1688-1694.
- Chang F.R., Chen J.L., Chiu H.F., Wu M.J. and Wu Y.C., Acetogenin From Seeds of *Annona reticulata*. *Phytochem.*, 1998; **47**, 1057-1061.
- Fang X.P., Rieser M.J., Gu Z.M., Zhao G.X. and McLaughlin J.L., Annonaceous Acetogenins: An Update Review. *Phyto-chem. Anal.*, 1993; **4**: 27-48.

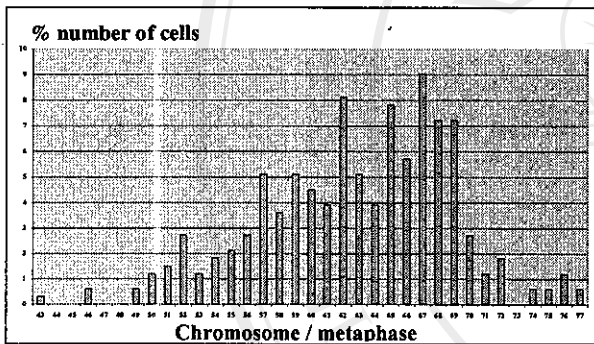
- Freshney R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 4th Edn., Willey-Liss, New York, 2000: 329-343.
- Gu Z.M., Zhao G.X., Oberlies N.H., Zeng L. and McLaugh J.L., Annonaceous Acetogenins: Potent Mitochondrial Inhibitors with Diverse Applications. *J. Nat. Prod.*, 1995; **997**: 242-248.
- Henderson, L.; Jones, E.; Brooks, T.; Chételat, A.; Chiliutti, P; Freemantle, M.; Howard, C.A.; Mackay, J.; Phillips, B.; Riley, S.; Roberts, C.; Wotton, A.K.; and van de Waart, E.J. 1997. Industrial genotoxicology group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies. *Mutagen.*, **12(3)**: 163-167.
- Hu Q., Xu J. and Chen L., Antimutagenicity of Selenium-Enriched Rice on Mice Exposure to Cyclophosphamide and Mitomycin C. *Cancer Lett.*, 2005; **220**: 29 – 35.
- Kamuhabwa A., Nshimo C. and de Witte P., Cytotoxicity of Some Medicinal Plant Extracts used in Tanzanian Traditional Medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 2000; **70**: 143-149.
- Klanginsirikul P., *Genotoxic Effect of Lannate on Lymphocytes of Agriculturists in Saraphi and Chom Thong Districts Chiang Mai Province*. MSc Thesis, Chiang Mai University, Thailand, 2003.
- Laboeuf M., Cave A., Bhaumik P.K., Mukherjee B. and Mukherjee R. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochem.*, 1982; **21**: 2783-2813.
- Major, J.; Jakab, M.; Kiss, G.; and Tompa, A. 1994. Chromosome aberration, sister-chromatid exchange, proliferative rate index, and serum thiocyanate concentration in smokers exposed to low-dose benzene. *Environ. Molec. Muta.*, **23(2)**: 137-142
- Mitchell A.D., *In Vitro Genetic Toxicity Testing*; in Gad S.C., ed., *In Vitro Toxicology*, 2nd Edn., Taylor & Francis, New York, London, 2000: 94-127.
- Morre D.J., De Cabo R., Farley C., Oberlies N.H. and McLaughlin J.L., 1995. Mode of Action of Bullatacin, a Potent Antitumor Acetogenin: Inhibition of NADH Oxidase Activity of HeLa and HL-60, but not Liver, Plasma Membranes. *Life Sci.*, 1995; **56**: 343-348.
- Rupprecht J.K., Hui Y-H., and McLaughlin J.L., Annonaceous Acetogenins: A Review. *J. Nat. Prod.*, 1990; **53**: 237-278.
- Sakuma M., Probit Analysis of Preference Data. *Appl. Entomol. Zool.*, 1998; **33**: 339-347.
- Schweighoffer, F.; Ait-Tkhlef, A.; Resnink, A.; Brinkman, B.; Melle-Milovanovic, D.; Laurent-Puig, P.; Kearsy, J.; and Bracco, L. 2000. Qualitative gene profiling: a novel tool in genomics and in pharmacogenomics that deciphers messenger RNA isoforms diversity. *Pharmacog.*, **1(2)**: 187-197.
- Tanamatayarat, P., *Cytotoxic Activity Screening of Some Rubiaceae Plants in Northern Thailand*. MSc Thesis, Chiang Mai University, Thailand, 2000.
- Walen K.H., The Origin of Transformed Cells: Studies of Spontaneous and Induced Cell Transformation in Cell Cultures From Marsupials, a Snail and Human Amniocytes. *Cancer Genet. Cytogen.*, 2002; **133**: 45-54.
- Woo S.H., Reynolds M.C., Sun N.J., Cassady J.M. and Snapka R.M., Inhibition of Topoisomerase II by Liriodenine. *Biochem. Pharmacol.*, 1997; **54**: 467-473.
- Wu Y.C., Hung Y.C., Chang F.R., Cosentino M., Wang H.K. and Lee K.H., Identification of Ent-16 beta, 17-Dihydroxykauran-19-oic Acid as an Anti-HIV Principle and Isolation of the New Diterpenoids Annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *J. Nat. Prod.*, 1996; **59**: 635-637.
- Yu J.G., Liu D., Xu L.Z. and Yang S.L., Studies on Chemical Structures of Two Iso-acetogenins From *Annona reticulata*. *Yao Xue Xue Bao.*, 1997; **32**: 914-919.
- Zeng L., Wu F.E., Oberlies, N.H., McLaughlin J.L., and Sastrodihadjo, S., Five new Monotetrahydrofuran Ring Acetogenins From the Leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, 1996; **59**: 1035-1042.



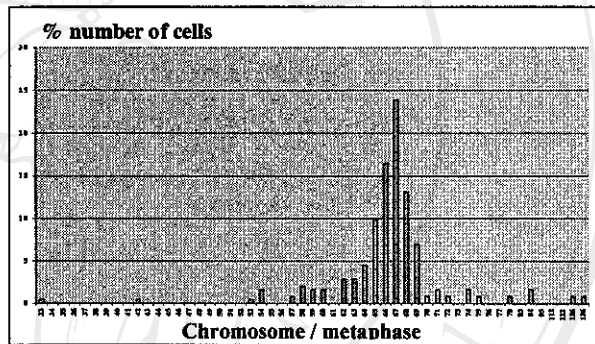
(A)



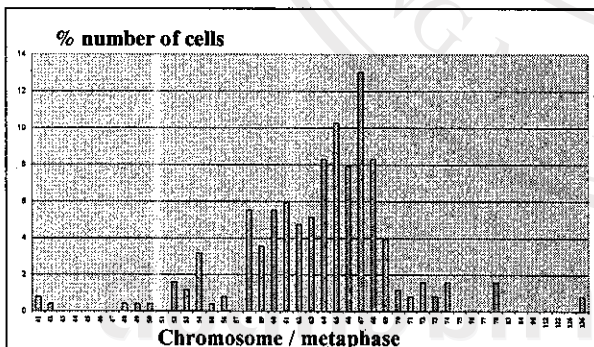
(B)



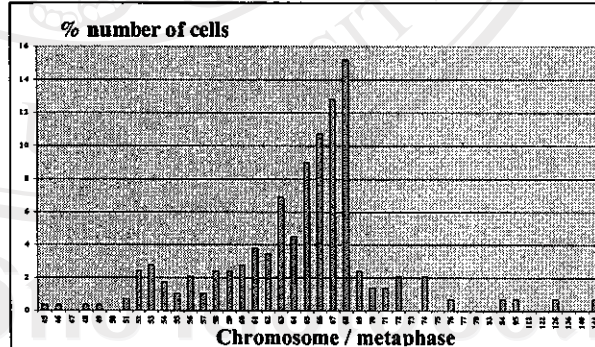
(C)



(D)



(E)



(F)

Figure 1 The total chromosome number patterns exhibited on each group of AMC-K46 cells. The cells exposed to; (A) cell-cultured medium, (B) DMSO, (C) MMC, (D) *A. reticulata*, (E) *A. squamosa*, and (F) *M. fruticosum*. Note that the chromosome number of 67 played the modal number in all groups of the cells.

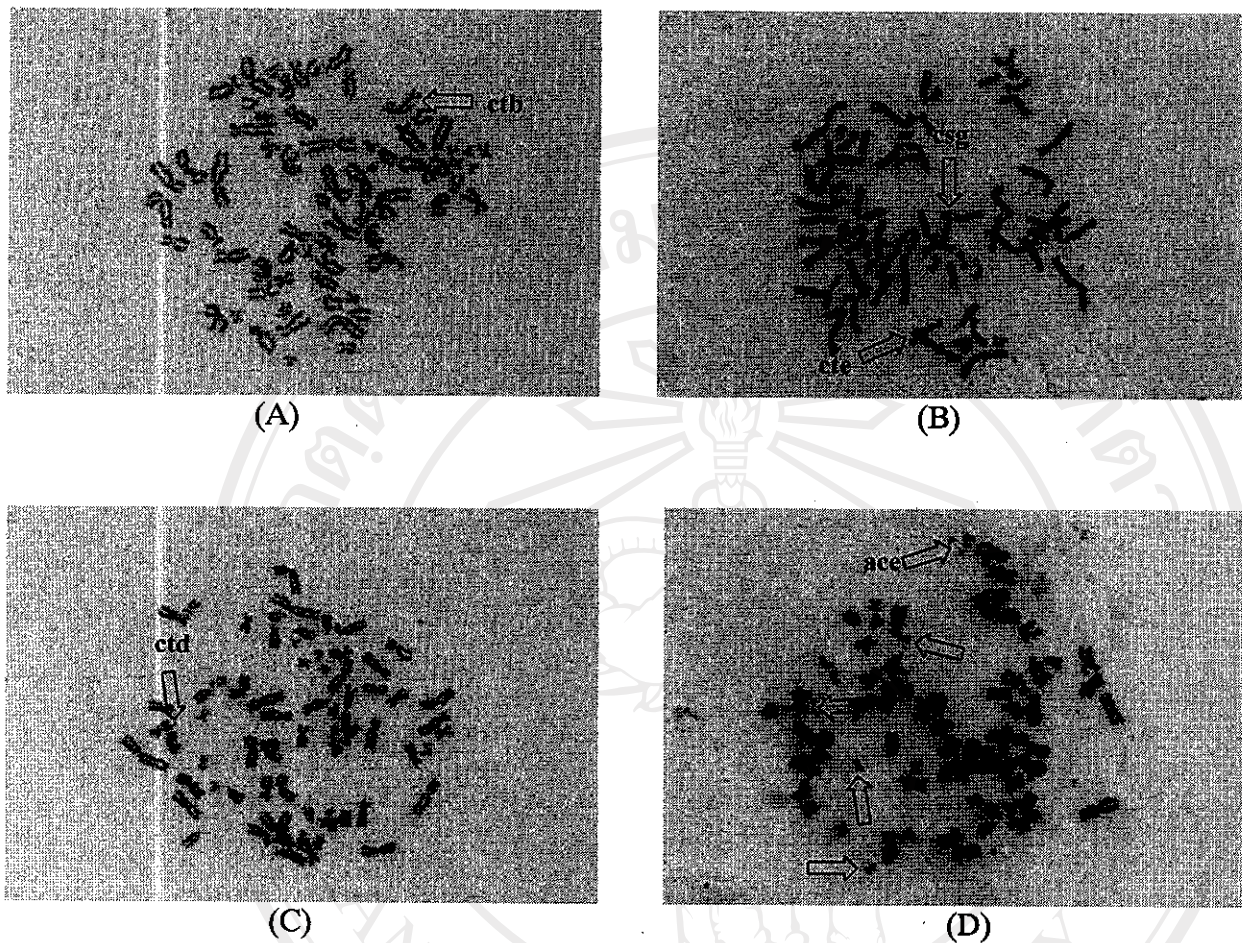


Figure 2 Example of the chromosome aberration on the AMC-K46 cells exposed with (A) DMSO, (B) MMC, (C) *A. reticulate* and (D) *M. fruticosum*. The abbreviation for the aberration was the same as in Table 2. All the arrows in (D) indicated the acentric fragment (ace).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved