



รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์พลัมบาจินจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*
ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

In vitro and in vivo studies of anthelmintic effects of crude
and purified extracts of *Plumbago indica* root on
Opisthorchis viverrini

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์พลัมบาจินจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*
ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

In vitro and in vivo studies of anthelmintic effects of crude
and purified extracts of *Plumbago indica* root on
Opisthorchis viverrini

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภวรรณ เสาวคนธ์

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2559

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ โศภน และรองศาสตราจารย์ ดร. สมาน เทศนา ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยอย่างดียิ่งตลอดมา รวมทั้งกรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์และให้ยืมสารเคมีเบื้องต้น ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สันติ วัฒนฐานะ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ช่วยจำแนกพันธุ์พืช นอกจากนี้ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาและศูนย์สัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ ในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 1, 9 และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่เสียสละเวลา ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณสัตว์ทดลองทุกชีวิตที่เสียสละทำให้เกิดการวิจัยในครั้งนี้ สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2556 ที่สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นภวรรณ เสาวคนธ์

กันยายน 2559

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

ปัจจุบันยาฆ่าพยาธิในท้องตลาดไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการยับยั้งการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ในตระกูล Opisthorchis การค้นหายาฆ่าพยาธิจึงเป็นเรื่องเร่งด่วน มีรายงานว่าสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin (PB) สามารถยับยั้งการเคลื่อนไหวกของหนอน *Caenorhabditis elegans* พยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma mansoni* และพยาธิใบไม้ในกระเพาะ *Paramphistomum cervi* ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงน่าจะมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าพยาธิได้เช่นเดียวกับ PB ดังนั้นวัตถุประสงค์การวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารสกัด PB และสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง (crude extract of *Plumbago indica* : cPI) ต่อพยาธิ *O. viverrini* ระยะ newly excystment juveniles (NEJs) และ 4 สัปดาห์ โดยประเมินค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนย้ายของตัวอ่อน ความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การป้องกันการติดเชื้อพยาธิ และการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยพยาธิถูกแบ่งออกเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่ม vehicle, กลุ่มที่ 3-5 พยาธิถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ผสมด้วยยาฆ่าพยาธิ praziquatel (PZQ) ใช้เป็นกลุ่ม positive control ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0, และ 10 $\mu\text{g/ml}$ เรียงตามลำดับ กลุ่มที่ 6-8 พยาธิถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วย PB และกลุ่มที่ 9-11 พยาธิถูกเลี้ยงในอาหารที่ผสมด้วย cPI โดยความเข้มข้นที่เท่ากับ PZQ หลังจากการประเมินการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวที่ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12 และ 24 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ stereomicroscope พยาธิถูกนำไปผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวโดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของ relative motility (RM) value ของพยาธิในระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ในกลุ่มที่ได้รับ PZQ ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า RM values ลดลงต่ำกว่ากลุ่มพยาธิที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมด้วย PB และ cPI แต่ค่าเฉลี่ยของ SI value ของกลุ่มที่ได้รับ cPI มีค่าใกล้เคียงกลุ่มที่ได้รับ PZQ เมื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงผิวพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ SEM พบว่าผิวของพยาธิในระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์เกิดตุ่มพอง ตุ่มแตก การกัดเซาะของผิวและมีการหลุดลอกของผิวพยาธิหลังชั่วโมงที่ 12 เมื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การป้องกันการติดเชื้อพยาธิพบว่าในกลุ่มที่ได้รับ PZQ มีเปอร์เซ็นต์การป้องกันการติดเชื้อพยาธิสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PB และ cPI อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับ PB และ cPI ค่ามากกว่า 70% ของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงว่าสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงมีประสิทธิภาพเป็นยาฆ่าพยาธิใบไม้ตับได้ในระดับดี ซึ่งควรพัฒนาต่อยอดในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบนี้ต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Presently, the commercial anthelmintic drug cannot effectively inhibit *Opisthorchis* spp. infection. The drug discovery is urgent. It was reported that the anthelmintic effect of purified plumbagin of *Plumbago indica* root inhibited the motility of *Caenorhabditis elegans*, *Schistosoma mansoni* and *Paramphistomum cervi*. We hypothesized that the crude extract from *P. indica* is possible to be used as an anthelmintic drugs. Therefore, this work aimed to investigate the anthelmintic effect of plumbagin (PB) and crude extract of *P. indica* root (cPI) on newly excystment juvenile (NEJs) and 4 week of *O. viverrini* on % larval migration, relative motility (RM) assay, survival index (SI), % protection, and observation of histopathological changes. Flukes were divided in to 11 treatment groups (n=10 per group). Group 1 was negative control, group 2 was vehicle (0.1% DMSO), groups 3-5; flukes were incubated with RPMI-1640 medium containing praziquatel (PZQ), to be used as the positive control in the serial concentrations; 0.1, 1.0, and 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Groups 6-8, were incubated with medium mixed with PB at 0.1, 1.0, and 10 $\mu\text{g/ml}$ and groups 9-11 were incubated with cPI of similar dosages. After *in vitro* experiments, the RM values were evaluated after 1, 3, 6, 12 and 24 h incubation using scoring under the stereomicroscopy. Then, they were collected from each observation time to run tissue processing for histopathological changes using SEM. The results showed that mean RM values of PZQ-treated groups at the concentration 10 $\mu\text{g/ml}$ in both NEJs and 4-week of *O. viverrini* were progressively decreased more than PB and cPI-treated groups but the mean SI values of cPI were similar to PZQ group. Observation under the SEM, revealed that NEJs and 4-week *O. viverrini* showed numerous blebs, disruption of blebs, erosion and desquamation of tegument after 12 h exposure. The percentage of worm protection in the PZQ-treated group was higher than PB and cPI groups. However, PB and cPI groups showed more than 70% worm protection. Our results suggest that cPI, which could be an effective anthelmintic drug and further investigation on the biologic activity of fraction of cPI should be performed.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ-ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย	6
ข้อตกลงเบื้องต้น	7
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล.....	8
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	9
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	15
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	16
บทที่ 4 อภิปรายผลการทดลองและบทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	33
ข้อเสนอแนะ	35
บรรณานุกรม	36
ประวัติผู้วิจัย	38

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1.1	การติดเชื้อพยาธิ <i>Opisthorchis viverrini</i> และพยาธิ <i>Clonorchis sinensis</i> ในคน	4
ตารางที่ 1.2	สปีชีส์อันดับโรคและสาเหตุที่ทำให้คนไทยตายทั้งเพศชายและเพศหญิงเมื่อปี 2547	4
ตารางที่ 2.1	การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรต่อการฟักตัวออกจากเปลือกซีสต์ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	10
ตารางที่ 2.2	การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ในระยะ NEJs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	12
ตารางที่ 2.3	การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ในระยะ 4 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	14
ตารางที่ 2.4	การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรต่อการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	15
ตารางที่ 3.1	ค่าร้อยละความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว RM values (%) ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ในระยะ NEJs ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ทดสอบยา PZQ, PB และ cPI ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ	20
ตารางที่ 3.2	ค่าร้อยละความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว RM values (%) ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ในระยะ 4 สัปดาห์ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ทดสอบยา PZQ, PB และ cPI ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ	26
ตารางที่ 3.3	ค่าเฉลี่ยจำนวนพยาธิใบไม้ตับ หลังจาก 4 สัปดาห์ที่ได้รับสารทดสอบทางปาก	32

ฉ
สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1.1	แสดงอุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> และพยาธิ <i>Clonorchis sinensis</i> ในประเทศกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้..... 2
รูปที่ 1.2	แสดงอุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ในประเทศไทย ที่สัมพันธ์กับโอกาสเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีในแต่ละจังหวัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 3
รูปที่ 1.3	การอุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สํารวจเมื่อปีพ.ศ. 2552 4
รูปที่ 2.1	ลักษณะของใบ ลำต้น รากและดอกของ <i>Plumbago indica</i> (<i>P. rosea</i>)..... 8
รูปที่ 3.1	ร้อยละของการฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> 17
รูปที่ 3.2	ร้อยละของการยับยั้งการฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> 17
รูปที่ 3.3	ร้อยละของการยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ 18
รูปที่ 3.4	ร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ NEJs 20
รูปที่ 3.5	ร้อยละดัชนีการรอดของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ NEJs 21
รูปที่ 3.6	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ NEJs 22
รูปที่ 3.7	ค่าเฉลี่ยร้อยละดัชนีการรอดของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ NEJs 22
รูปที่ 3.8	ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ NEJs 24
รูปที่ 3.9	ร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ 4 สัปดาห์ 26
รูปที่ 3.10	ร้อยละดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> 4 สัปดาห์ 27
รูปที่ 3.11	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ 4 สัปดาห์ 28
รูปที่ 3.12	ค่าเฉลี่ยร้อยละดัชนีการรอดของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ 4 สัปดาห์ 28
รูปที่ 3.13	ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i> ระยะ 4 สัปดาห์ หลังจากได้รับสารต่าง 30
รูปที่ 3.14	แสดงน้ำหนักของสัตว์ทดลองหลังจากเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อพยาธิแล้ว ให้สาร PZQ, PC และ cPI เทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle 31

ช
สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 3.15	
ร้อยละของการลดลงของจำนวนพยาธิหลังได้รับสารทดสอบทางปาก ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kgBW ของ PZQ, PB และ cPI เทียบกับ กลุ่มควบคุม และกลุ่ม vehicle.....	32

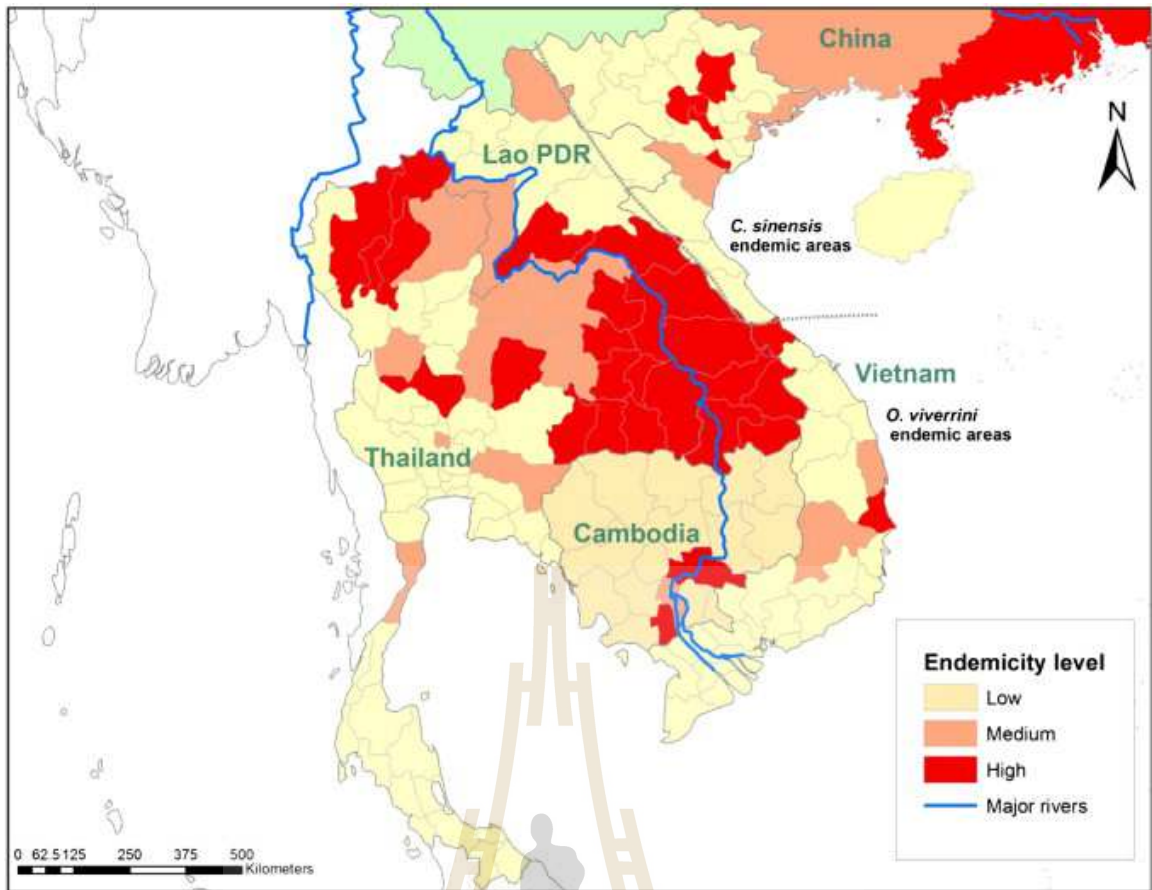


บทที่ 1

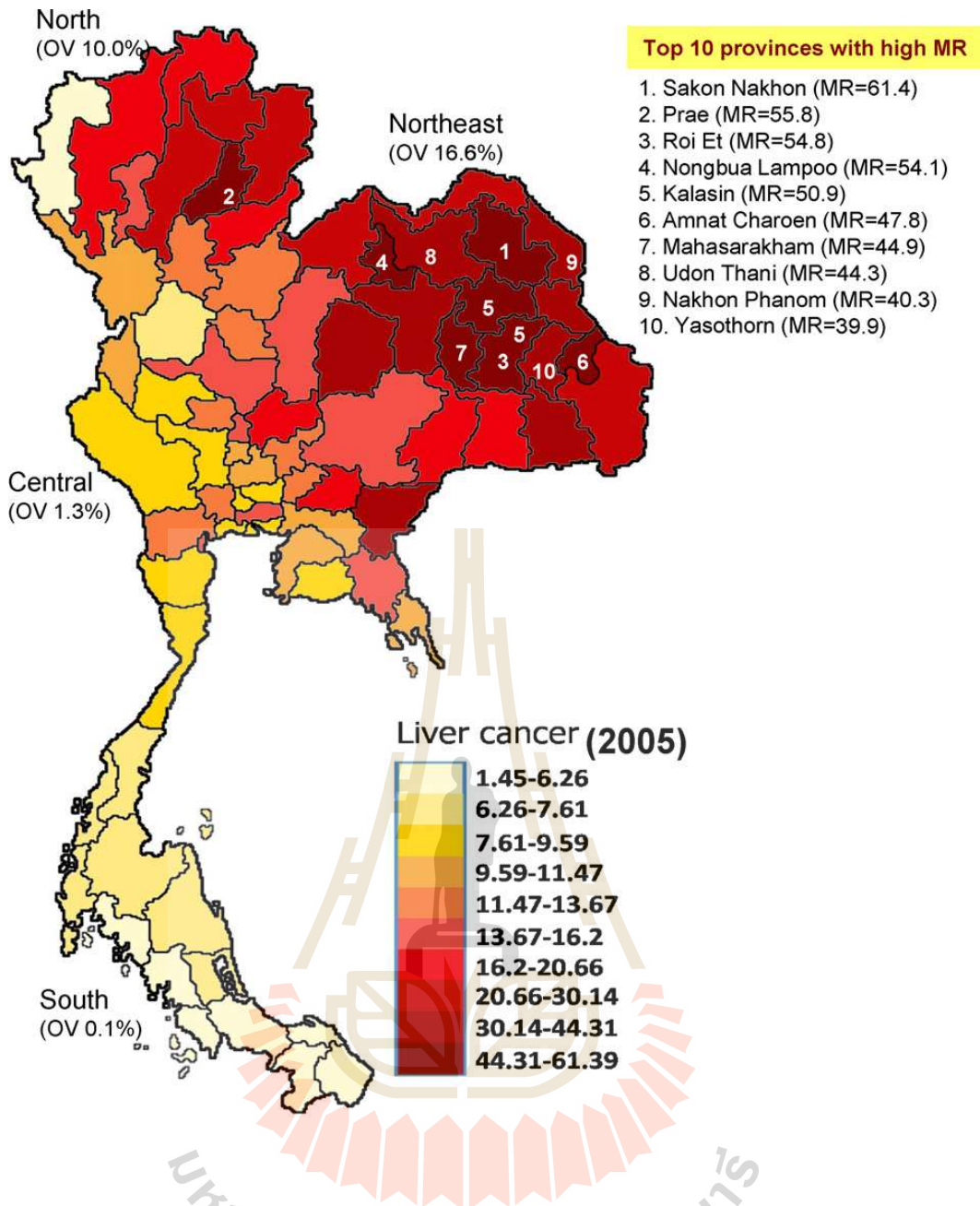
บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

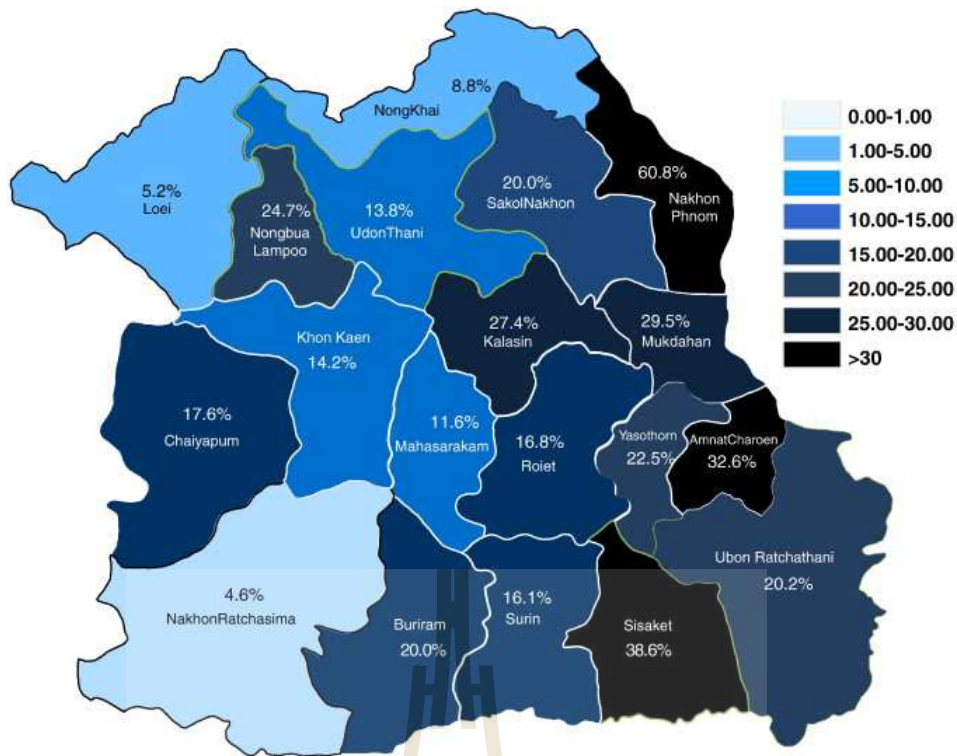
พยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* เป็นพยาธิตัวแบนที่พบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะพื้นที่ทางตอนล่างของแม่น้ำโขง พยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* ทำให้เกิดโรค Ophisthorchiasis เนื่องจากพฤติกรรมวัฒนธรรมการบริโภค โดยชุมชนที่อาศัยอยู่บริเวณลุ่มน้ำโขงนิยมบริโภคอาหารที่ทำจากปลาดิบ อาหารสุก ๆ ดิบ ๆ เช่น ก้อยปลาหรืออาหารหมัก เช่น ปลาร้า ปลาสาม หรือส้มผัก ที่มีการปนเปื้อนด้วยไข่พยาธิ ซึ่งพบว่าอุบัติการณ์ของการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* มีประมาณ 9 ล้านคน ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (รูปที่ 1.1-1.3) และในประเทศสาธารณรัฐประชาชนลาว (Jongsuksuntigul and Imsomboon, 2003; Sithithaworn and Haswell-Elkins, 2003) ในลาวพบว่ามีมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* ในเด็กประถมวัยประมาณ 3000 โรงเรียน ใน 17 จังหวัด ซึ่งเป็นจังหวัดติดลุ่มน้ำโขงตอนล่างคิดเป็น 10.9% ของประชากรลาวและจากการสำรวจในปี 2550 ทางตอนใต้ของจังหวัดจำปาสักพบว่า ประชากรที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* มีประมาณ 58.5% จากการสุ่มตัวอย่าง 814 คน ใน 13 หมู่บ้าน (Sayasone et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการติดเชื้อพยาธิในกัมพูชาและเวียดนาม แต่ไม่มีการทำสถิติไว้ (ตารางที่ 1.1) จากสถิติสำรวจประชากรที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* ในประเทศไทยในปี 2544 พบว่ามีประมาณ 6 ล้านคน เป็นผู้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิ โดยเฉพาะจังหวัดติดลุ่มแม่น้ำโขงและจังหวัดขอนแก่น (Aunpromma et al., 2012; Sithithaworn et al., 2012) การติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ทำให้เป็นโรคตับและทางเดินท่อน้ำดี ซึ่งทำให้เกิดอาการตับโต ท่อน้ำดีอักเสบ นิ่วในท่อน้ำดี และเกิดพังผืดที่ตับและทางเดินท่อน้ำดี ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้ผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ พัฒนาให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งประเทศไทยมีอุบัติการณ์สูงที่สุดในโลก (Sripa et al., 2007, 2011) โดยติดอันดับ 4 ใน 10 ของโรคที่ทำให้เกิดการตายในคนไทย (ตารางที่ 1.2)



รูปที่ 1.1 อุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และพยาธิ *Clonorchis sinensis* ในประเทศกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีการระบาดติดเชื้อพยาธิระดับต่ำ (0–5%); ระดับปานกลาง (5.1–15%) และระดับสูง (มากกว่า 15%) ตามลำดับ (ที่มา Sithithaworn et al.,2012)



รูปที่ 1.2 อุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในประเทศไทยที่สัมพันธ์กับโอกาสเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี ในแต่ละจังหวัด หน่วย (ล้านคน) (ที่มา Sripa et al., 2011)



รูปที่ 1.3 การอุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สํารวจเมื่อปีพ.ศ. 2552 (ที่มา Sithithaworn et al., 2012)

ตารางที่ 1.1 การติดเชื้อพยาธิ *Opisthorchis viverrini* และพยาธิ *Clonorchis sinensis* ในคน (ที่มา Sripa et al., 2011)

Country	Disease	Estimated numbers		References
		Infected	CCA	
Thailand	Opisthorchiasis	8 million	5000	Parkin (2006)
Lao PDR	Opisthorchiasis	2 million	>100 ^a	Andrews et al. (2008)
Cambodia	Opisthorchiasis	ND	ND	
Vietnam	Clonorchiasis	ND	>100 ^a	Shin et al. (2010)
China	Clonorchiasis	12.5 million	800 ^a	Lun et al. (2005)
Korea	Clonorchiasis	ND	200	

^a Probable underestimates. ND, not determined. CCA, cholangiocarcinoma.

ตารางที่ 1.2 สิบอันดับโรคและสาเหตุที่ทำให้คนไทยตายทั้งเพศชายและเพศหญิงเมื่อปี 2547 (ที่มา Sripa et al., 2011)

Rank	Male		Female			
	Disease	Deaths (thousands)	%	%	Deaths (thousands)	Disease
1	HIV/AIDS	26	11.1	14.7	26	Stroke
2	Stroke	23	10.0	8.0	14	Diabetes
3	Traffic accidents	23	9.9	6.6	12	Ischemic heart disease
4	Liver and bile duct cancer	19	8.0	6.2	11	HIV/AIDS
5	COPD	14	5.9	4.9	9	Liver and bile duct cancer
6	Ischemic heart disease	13	5.6	3.8	7	Lower respiratory tract infections
7	Bronchus and lung cancer	9	3.7	3.4	6	COPD
8	Diabetes	8	3.5	3.2	6	Nephritis and nephrosis
9	Cirrhosis	8	3.4	2.9	5	Traffic accidents
10	Lower respiratory tract infections	7	2.9	2.5	4	Cervix uteri cancer

ตามแผนพัฒนาการสาธารณสุขแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ.2550-2555) ได้กำหนดให้ใช้อัตรากาความชุกและความรุนแรงของโรคพยาธิใบไม้ตับและพยาธิปากขอ เป็นดัชนีชี้วัดที่บ่งถึงสภาพปัญหา โดยได้กำหนดเป้าหมายให้ลดความชุกของโรคหนอนพยาธิต่าง ๆ โดยเฉพาะพยาธิใบไม้ตับ ให้เหลือไม่เกินร้อยละ 5 ลดระดับความรุนแรงของโรคหนอนพยาธิให้อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งจากการสำรวจในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทยพบว่าอัตราการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ไม่ได้ลดลงเลย (Jonsuksuntigul and Imsomboon, 2003) กรณีผู้ป่วยเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ หากปล่อยเวลาในการติดเชื้อนาน ๆ ก็จะมีโอกาสพัฒนาเป็นผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งแทบหมดหนทางทางรักษาให้หายได้ (Tansurat, 1971; Bhamarapravati et al., 1978; Harinasuta et al., 1984; Riganti et al., 1989; Sripa and Pairojkl 2008) เนื่องจากโรค Ophisthorchiasis ไม่ก่อให้เกิดโรคในระยะเฉียบพลัน ทำให้นักวิจัยมุ่งประเด็นไปยังโรคที่ก่อให้เกิดโรคในระยะเฉียบพลัน ทำให้ปัญหาโรคพยาธิใบไม้ตับยังคงส่งผลกระทบต่อภาวะสุขภาพของประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นภูมิภาคที่มีอัตราป่วยสูงสุดในประเทศไทย ถึงแม้ว่าจะมีการรณรงค์ตัดวงจรการติดเชื้อเป็นเวลามายาวนานและต่อเนื่อง แต่ก็ไม่ได้ทำให้อัตราการติดเชื้อหนอนพยาธิลดลง จึงเป็นปัญหาที่จำเป็นจะต้องดำเนินการแก้ไขในหน่วยงานทุกระดับที่เกี่ยวข้อง ตั้งแต่การเก็บข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยา ปัจจัยเสี่ยงและการควบคุมโรค รวมทั้งลดการระบาด โดยการตัดวงจรของโรคหนอนพยาธิจากสัตว์สู่มนุษย์ รวมทั้งการรักษาตั้งแต่การติดเชื้อในระยะเริ่มแรก ทั้งนี้ต้องให้คำแนะนำและให้ความรู้เกี่ยวกับโรคหนอนพยาธิและโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อชุมชนกลุ่มเป้าหมาย เพื่อป้องกันการระบาดโรคและลดการสูญเสียประชากรในกลุ่มที่กำลังขับเคลื่อนพัฒนาประเทศของเรา

การวินิจฉัยโรคหนอนพยาธิส่วนใหญ่ใช้การตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระ ในน้ำดี หรือในของเหลวจากลำไส้เล็กส่วนต้น ซึ่งการตรวจอุจจาระเพื่อหาไข่พยาธิเป็นวิธีที่สะดวก ราคาไม่แพงและผู้ตรวจไม่เจ็บ ซึ่งมีทั้งวิธี Formalin ether concentration technique (FECT), modified quick Kato Katz thick smear และ Stoll's dilution egg count technique (Viyant et al., 1983; Elkins et al., 1990; Hong et al., 2003) แต่ลักษณะของไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* คล้ายกับไข่พยาธิในตระกูล Opisthorchiidae ทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาดได้ง่าย (Sripa et al., 2011) จึงมีการคิดค้นวิธีการตรวจวินิจฉัยทางเซรัมเพื่อพัฒนาใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยติดเชื้อพยาธิ ได้ผลที่แม่นยำและจำเพาะต่อพยาธิดีกว่าการตรวจอุจจาระ เช่น การตรวจหาโปรตีนของเปลือกไข่พยาธิ (recombinant *O. viverrini* egg shell protein: rOVESP) ด้วยวิธี ELISA (Ruangsittichai et al., 2006) เป็นต้น การรักษาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* นิยมให้ยาถ่ายพยาธิคือ praziquantel ซึ่งออกฤทธิ์กว้างครอบคลุมพยาธิตัวแบนทุกชนิด แต่กลับพบว่าการรักษาอาการตับและทางเดินท่อน้ำดีไม่ได้ดีขึ้นและแนวโน้มการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีไม่ลดลงด้วยเช่นกัน (Pinlaor et al., 2008) เนื่องจากอาการแสดงออกจะเห็นได้ชัดต้องใช้เวลาานแสดงว่ายาอาจจะไม่ช่วยฆ่าพยาธิ หากมีการติดเชื้อระยะเรื้อรังและอาจจะมีการตื้อยาเกิดขึ้นในภายหลังข้อเสียจากการให้ยาฆ่าพยาธิคือ เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงและอาจมีการตื้อยาตามมา ดังนั้นการมองหาทางเลือกในการใช้ยากำจัดพยาธิที่มาจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเช่น สมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความรู้ในการศึกษา ในการทดลองที่นำเสนอนี้เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบและสารสกัด

บริสุทธิ์ plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงกับผลของ praziquantel ที่มีต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

พลัมบาจิน (plumbagin) เป็นสารสกัดบริสุทธิ์ได้จากรากเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica*) ซึ่งมีรายงานว่าให้ผลต่อการฟักตัวของพยาธิตัวกลม *Haemonchus contortus* และ *Ascaris suum* (Fetterer and Fleming, 1991) และ plumbagin ที่สกัดได้จากรากเจตมูลเพลิงแดงมีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลม *Caenorhabditis elegans* และพยาธิตัวแบน *Schistosoma mansoni* (Atjanasuppat et al., 2009), พยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma mansoni* และพยาธิใบไม้ตับวัว *Fasciola gigantica* (Lorsuwannarat et al., 2013, 2014) และในพยาธิใบไม้ในกระเพาะ *Paramphistomum cervi* (Saowakon et al., 2013) ดังนั้น plumbagin น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยากำจัดพยาธิตัวแบนชนิดอื่นได้ เช่น ต้านพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองได้ เนื่องจาก plumbagin เป็นสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดง จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง อาจจะสามารถใช้เป็นยาฆ่าพยาธิได้เช่นเดียวกับ plumbagin

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระหว่าง praziquantel และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิ ที่เกิดจากผลของยาฆ่าพยาธิ praziquantel และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ จะทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงและยา praziquantel ต่อพยาธิใบไม้ตับในหลอดทดลอง ด้วยการวัดปริมาณการฟักตัวออกจากเปลือกไข่และการเคลื่อนที่ผ่านตะแกรงแผ่นกรองสังเคราะห์ โดยใช้พยาธิระยะ metacercaria เหนียวน้ำให้ไข่ออกจากเปลือกไข่และให้ไขผ่านตะแกรงสังเคราะห์ (excystment tower) วัดจำนวนการไชของพยาธิออกจากเปลือกและร้อยละการยับยั้งการเคลื่อนย้ายของพยาธิ และดูการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิหลังแช่ในสารแต่ละชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงและยา praziquantel ต่อพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง โดยการเหนียวน้ำให้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* หลังจากนั้นจะป้อนสารสกัดหรือยาฆ่าพยาธิ เพื่อทำการวัด percent protection จากการเก็บพยาธิจากตับและทางเดินท่อน้ำดี วัดขนาดและจำนวนพยาธิที่พบเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม โดยใช้ค่าสถิติ one-way ANOVA ที่ความน่าเชื่อถือ 95% ด้วยโปรแกรม SPSS software

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ผลการทดลองจากการศึกษาในครั้งนี้ จะสามารถนำข้อมูลที่ได้มาอธิบายและประยุกต์ใช้ได้ดังนี้
 - 1.1 นำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อการฟักตัวของพยาธิ รวมทั้งการยับยั้งเคลื่อนไหวของพยาธิ
 - 1.2 นำมาประยุกต์และพัฒนาการใช้สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อการติดเชื้อพยาธิ เพื่อลดหรือป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ก่อนนำไปสู่โรคตับและทางเดินท่อน้ำดี รวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งจะทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ ที่ต้องใช้ระยะเวลาในการรักษานาน
 - 1.3 ใช้เป็นข้อมูลในจัดประชุมวิชาการเชิงปฏิบัติการ เพื่ออบรมให้ความรู้แก่เจ้าหน้าที่สาธารณสุขขององค์กรท้องถิ่น เกี่ยวกับโรคนี้เพื่อวางแผนป้องกันควบคุมอย่างยั่งยืน
 - 1.4 มีข้อมูลโรคพยาธิใบไม้ตับ สำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษา ค้นคว้าและพัฒนางานวิจัยในครั้งต่อไป
 - 1.5 การเผยแพร่
 - นำผลการวิจัยไปเผยแพร่ในงานประชุมนานาชาติหรือตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติเพื่อให้เป็นที่ยอมรับของภาคส่วนงานวิชาการ
 - เผยแพร่ความรู้สู่ชุมชนและสู่ระบบสาธารณสุขพื้นฐานโดยจะทำการศึกษาต่อยอดภายหลังได้รับทุนนี้ โดยเริ่มจากการใช้กับสัตว์เลี้ยงจริงในเขตพื้นที่ใกล้เคียง

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

1. ผลการทดลองสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการขอกุณภายนอก เช่น ทุน สวก. หรือ สกว. เป็นต้น
2. นำไปเสนอในการประชุมระดับชาติ/ นานาชาติ
 - นำเสนอผลงานระดับชาติ/ นานาชาติ โดยนำผลงานที่ได้ไปเผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ เช่น The Joint International Tropical Medicine Meeting (JITMM) ซึ่งกลุ่มเป้าหมายคือนักวิจัย นักวิชาการที่ทำงานด้านปรสิตวิทยา และโรคเขตร้อน โดยในแต่ละปีมีผู้สนใจทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเป็นจำนวนมาก
3. ถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยสู่ชุมชน ที่มีความสนใจ เพื่อให้มีความสามารถในเพาะปลูกต้นเจตมูลเพลิงแดงและนำไปประยุกต์ในทางสาธารณสุข
4. ช่วยชุมชนประชาสัมพันธ์ เพื่อให้ผลและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดง เป็นที่รู้จักมากขึ้น โดยช่วยออกแบบเอกสารแผ่นพับ โปสเตอร์ เพื่อประชาสัมพันธ์ความรู้ และประโยชน์เกี่ยวกับสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดง ให้แก่ผู้สนใจทั่วไป

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

2.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการสกัดสารจากพืชตัวอย่าง

สารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดง ได้จัดซื้อจากบริษัท S.M Chemical จำกัด ส่วนสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง ทำโดยนำรากเจตมูลเพลิงแดง จากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำปาง นำมาพิสูจน์รูปพรรณสัณฐานทางชีววิทยา โดยอาจารย์ ดร. สันติ วัฒนฐานะ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยอ้างอิงจากลักษณะดอก ใบ ลำต้นและราก (รูปที่ 2.1) หลังจากล้างเศษดินและสิ่งที่เป็นเปื้อนออกจนสะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นในครั้งสุดท้ายแล้ว นำไปอบผ่านลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C หลังจากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร ผงสมุนไพรที่ได้ถูกเก็บในถุงที่ปิดสนิท ในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปสกัดต่อในขั้นต่อไป



รูปที่ 2.1 ลักษณะของใบ ลำต้น รากและดอกของ *Plumbago indica* (*P. rosea*) ส่วนของใบและลำต้น (1), ราก (2) และดอก (3)

การเตรียมสารสกัดจากพืช นำผงสมุนไพรของรากเจตมูลเพลิงแดงที่ตากแห้ง ไปสกัดใน 95% ethanol ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) เขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) แล้วนำสารละลายดังกล่าว ทำให้เข้มข้นขึ้น โดยผ่านเครื่องระเหยแห้งความดันต่ำ (rotary evaporator) โดยค่อย ๆ ลดความดัน แล้วแยก 95% ethanol ออก เมื่อของเหลวลดลงเหลือประมาณ 1/5 จึงนำสารสกัดที่ได้ ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทดลอง และหาเปอร์เซ็นต์ yield ที่ได้จากสารสกัดว่ามีปริมาณเท่าไรคิดเป็นกิโลเปอร์เซ็นต์ตั้งสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\% \text{ Yield (g/100 g of dry plant material)} = (W1 \times 100) / W2$$

W1 คือ น้ำหนักของสารสกัดหยาบหลังทำให้แห้ง (กรัม) และ W2 น้ำหนักของสมุนไพรแห้ง (หยาบ) ก่อนทำการสกัด (กรัม)

2.2 ยาฆ่าพยาธิ

ยาฆ่าพยาธิ praziquantel (PZQ) (Wormicide, Greater Pharma Co.) ขอความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ โสภณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์ (พญาไท) มหาวิทยาลัยมหิดล ในการทดลองครั้งนี้

2.3 การเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างพยาธิ *O. viverrini*

2.3.1 เก็บตัวอย่างพยาธิจากปลา

เก็บตัวอย่างปลากลุ่มวงศ์ตะเพียนที่อยู่ในพื้นที่ที่เขตคำม่วน สาธารณรัฐประชาชนลาว และประเทศไทย ณ จังหวัดมุกดาหารและนครพนม ซึ่งเป็นพื้นที่ติดแม่น้ำโขง เนื่องจากพบการติดเชื้อของไข่พยาธิใบไม้ตับชนิดนี้สูงกว่าในเขตนครชัยบุรีนทร์ ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา ได้จากการเก็บมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่นั้น ๆ จึงแบ่งการเก็บกลุ่มตัวอย่างปลาแต่ละแหล่งอย่างละ 200 กิโลกรัม

2.3.2 การเตรียมตัวอย่างปลาตรวจหาและแยกแยะพยาธิใบไม้ตับด้วยวิธี Pepsin-HCl digestion

การเตรียมตัวอย่างทำตามวิธีของ Pinlaor et al (2004) ดังนี้ นำเนื้อปลาแต่ละชนิดมาบดด้วยเครื่องบดเนื้อ แล้วนำเนื้อที่บดมาผสมกับสารเคมี 0.1% pepsin ใน 0.1% HCl และปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้ จากนั้นนำมาบ่มด้วยเครื่อง shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วนำมารองด้วยตระแกรงขนาดต่าง ๆ ล้างด้วยสารละลาย 0.85% NaCl อย่างน้อย 3 ครั้ง/ขนาดของตะแกรง แล้วนำส่วนที่เหลือหลังจากการกรองเทใส่ sedimentary jar และตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เมื่อได้ตะกอนละเอียด สะอาดแล้วนำตะกอนสุดท้ายไปตรวจดูด้วยกล้อง stereomicroscope โดยนักชำนาญการทางปรสิตวิทยา เพื่อคัดเลือกพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ metacercaria ที่มีลักษณะสมบูรณ์ ใส่หลอดทดลองเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อทำการทดลองต่อไป

2.4 การศึกษาการยับยั้งการฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ (Excystment inhibition)

เป็นวิธีศึกษาการยับยั้งการเหนี่ยวนำให้มีการฟักออกจากซิสต์ ซึ่งปรับปรุงจากการศึกษาของ Saowakon et al (2009) โดยสรุปดังนี้ นำพยาธิระยะ metacercaria ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาณ metacercaria 1000 เม็ด/มิลลิลิตร แบ่งใส่ในงานเลี้ยงเชื้อชนิด 6 หลุม (6-wells-plate) โดยดูสารละลาย 0.85% NaCl ที่มีพยาธิปริมาณจำนวน 40 เม็ด/100 µl/หลุม หลังจากนั้นเติมสารละลาย

Tyrode's ที่มี 0.1% DMSO (v/v) และ 0.2% Trypsin (w/v) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการฟักตัวของพยาธิออกจากเปลือกซิสต์ (excyst) สำหรับกลุ่มควบคุม และสารที่ทดสอบที่ความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 10 กลุ่ม (ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.1) ส่วนกลุ่มอื่น ๆ ที่ได้รับสารทดสอบทั้งยา PZQ, plumbagin (PB) และสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง (crude *Plumbago indica*: cPI) ถูกนำมาละลายใน 0.1% DMSO (v/v) เพื่อเป็นการป้องกันพิษที่อาจเกิดขึ้นจากตัวทำละลาย โดยความเข้มข้นของสารละลายที่ทดสอบทุกชนิดเท่ากับ 0.1, 1 และ 10 µg/ml เรียงตามลำดับของสารทดสอบทั้งสามชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนพยาธิที่พยาธิที่ออกจากซิสต์หรือ newly excysted juveniles (NEJs) ในแต่ละกลุ่มการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereomicroscope แล้วนำค่าที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการฟักตัวออกจากเปลือกไข่ของพยาธิดังสมการทางด้านล่าง โดยทำการทดลองซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง ข้อมูลที่ได้จากกลุ่มควบคุม นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การฟักออกจากซิสต์ของพยาธิ เพื่อใช้ในการทดลองผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองต่อไป

ตารางที่ 2.1 การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรต่อการฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

กลุ่มที่ 1:	กลุ่มควบคุม (artificial bile +0.1% DMSO)
กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ได้รับยา praziquantel ความเข้มข้นที่ 0.1 µg/ml
กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ได้รับยา praziquantel ความเข้มข้นที่ 1 µg/ml
กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ได้รับยา praziquantel ความเข้มข้นที่ 10 µg/ml
กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ได้รับสาร plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงความเข้มข้นที่ 0.1 µg/ml
กลุ่มที่ 6	กลุ่มที่ได้รับสาร plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงความเข้มข้นที่ 1 µg/ml
กลุ่มที่ 7	กลุ่มที่ได้รับสาร plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงความเข้มข้นที่ 10 µg/ml
กลุ่มที่ 8	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง (cPI) ความเข้มข้นที่ 0.1 µg/ml
กลุ่มที่ 9	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง (cPI) ความเข้มข้นที่ 1 µg/ml
กลุ่มที่ 10	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง (cPI) ความเข้มข้นที่ 10 µg/ml

$$\% \text{ Excystment inhibition} = \frac{\sum (\text{กลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ})}{\text{กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

กลุ่มควบคุม : ค่าเฉลี่ยของจำนวนพยาธิในกลุ่มควบคุมที่ฟักออกจากเปลือก

กลุ่มทดสอบ : ค่าเฉลี่ยของจำนวนพยาธิในกลุ่มทดสอบที่ฟักออกจากเปลือก

นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบผลของสารทดสอบชนิดต่าง ๆ ต่อการฟักตัวออกจากเปลือก โดยใช้โปรแกรม SPSS แสดงผลในรูปแบบตารางแจกแจงความถี่ร้อยละ ค่าความสัมพันธ์ (P-value < 0.05 ถือว่ามีระดับนัยสำคัญทางสถิติ) ข้อมูลจะถูกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติ analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS

2.5 การศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนย้ายพยาธิใบไม้ตับผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ ด้วยวิธี modified migration inhibition

วิธีการเหมือนการเหนี่ยวนำให้พยาธิฟักออกจากเปลือกซีสต์ ดังรายละเอียดในหัวข้อ 2.4 โดยนำพยาธิระยะ metacercaria ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาณ metacercia 50 เม็ด/100 μ l ใส่ในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเชื้อชนิด 6 หลุม (6-wells-plate) ที่บรรจุตะแกรง (excystment tower) ซึ่งมีตาข่ายขนาด 200 mesh ภายในมีสารละลาย Tyrode's ที่มี 0.1% DMSO (v/v) และ 0.2% Trypsin (w/v) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการฟักตัวของพยาธิออกจากเปลือกซีสต์ ส่วนกลุ่มอื่น ๆ เหมือนกับในตารางที่ 2.1 โดย incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ของพยาธิไขผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ที่ชั่วโมงที่ 12 นับจำนวนพยาธิที่ผ่าน excystment tower ในแต่ละกลุ่มการทดลองโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ stereomicroscope แล้วนำค่าที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนย้ายพยาธิใบไม้ตับผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ดังสมการทางด้านล่าง ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

$$\% \text{ Larval migration inhibition} = \frac{\sum (\text{กลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ})}{\text{กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

กลุ่มควบคุม : จำนวนพยาธิในกลุ่มควบคุมที่ไขผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์

กลุ่มทดสอบ : จำนวนพยาธิในกลุ่มทดสอบที่ไขผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์

นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบผลของสารทดสอบชนิดต่าง ๆ ต่อการไขผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม Sigmastat 3.5 แสดงผลในรูปแบบตารางแจกแจงความถี่ ร้อยละ ค่าความสัมพันธ์ (P-value < 0.05 ถือว่ามีระดับนัยสำคัญทางสถิติ) ข้อมูลจะถูกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติ analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS

2.6 การศึกษาผลของสารสกัดของรากเจตมูลเพลิงแดงและยา praziquantel ในหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง

2.6.1 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบของรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะ NEJs ในหลอดทดลอง

เหนี่ยวนำให้พยาธิฟักออกจากเปลือกซีสต์ ดังรายละเอียดในหัวข้อ 2.4 โดยนำพยาธิระยะ metacercaria ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาณ metacercia 1000 เม็ด/มิลลิลิตร ใส่ในจานฟักพยาธิ (glass excystment jar) ภายในมีสารละลาย Tyrode's ที่มี 0.2% Trypsin (w/v) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการฟักตัวของพยาธิออกจากเปลือกซีสต์ โดย incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วใช้ glassy pipette ดูพยาธิที่มีการเคลื่อนไหวทุกส่วน ใส่ใน 6-wells-plate โดยมีพยาธิระยะ NEJs 30 ตัว/หลุม/ช่วงการสังเกต incubate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ที่เติม antibiotic drug (penicillin G, 50 IU/ml; Gentamycin 10 μ g/ml, Gibco) และสารทดสอบชนิดอื่น ๆ (รายละเอียดอยู่ในตารางที่ 2.2) ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศอิ่มตัวและมี 5% carbon dioxide ตรวจสอบการเคลื่อนไหวของพยาธิและการรอดชีวิตของพยาธิที่ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12 และ 24 เรียงตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาบันทึกหาค่า % relative

motility และ % survival index จากสมการด้านล่าง โดยค่าความสัมพันธ์ (P-value < 0.05 ถือว่ามีระดับนัยสำคัญทางสถิติ) ข้อมูลจะถูกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติ analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรมSPSS ทำการทดสอบซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง หลังจากทดลองเสร็จนำพยาธิไปผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

ตารางที่ 2.2 การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะ NEJs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

กลุ่มที่		จำนวนพยาธิระยะ NEJs ในแต่ละช่วงการสังเกต				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Control (-)		30	30	30	30	30
Vehicle (0.1% DMSO)		30	30	30	30	30
PCZ ($\mu\text{g/ml}$)	0.1	30	30	30	30	30
	1	30	30	30	30	30
	10	30	30	30	30	30
PB ($\mu\text{g/ml}$)	0.1	30	30	30	30	30
	1	30	30	30	30	30
	10	30	30	30	30	30
cPI ($\mu\text{g/ml}$)	0.1	30	30	30	30	30
	1	30	30	30	30	30
	10	30	30	30	30	30

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนไหว (% relative motility) และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของพยาธิ (% Survival index) (ที่มา Kiuchi et al., 1987; Lorsuwannarat et al., 2013)

$$\text{RM value} = \frac{\text{MI test} \times 100}{\text{MI control}}$$

$$\text{Motility index (MI)} = \frac{\sum nN}{N}$$

n = คะแนนที่ได้ตามเกณฑ์ของการเคลื่อนไหว, N = จำนวนพยาธิที่สังเกตและให้คะแนน
เกณฑ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ ระยะ NEJs ประยุกต์จาก Saowakon et al (2009)

2 = เคลื่อนไหวทุกส่วนของร่างกาย

1 = ไม่ขยับหรือไม่เคลื่อนไหว แต่ไม่ตาย เนื่องจากไม่ติดสี 1 % methylene blue ซึ่งใช้เป็นตัว
ยืนยันทดสอบการตาย

0 = ไม่ขยับหรือไม่เคลื่อนไหวและตาย เนื่องจากติดสี 1 % methylene blue

$$\text{Survival index (SI)} = \frac{\text{จำนวนพยาธิที่มีชีวิตในกลุ่มนั้น} \times 100}{\text{จำนวนพยาธิทั้งหมดในกลุ่ม}}$$

พยาธิที่มีชีวิต = พยาธิทุกตัวที่ได้คะแนนตั้งแต่ 1 เป็นต้นไป

พยาธิที่ตาย = พยาธิทุกตัวที่ได้คะแนนเท่ากับ 0

2.6.2 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบของรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง

หนูแฮมสเตอร์เพศผู้พันธุ์ golden Syrian อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 40 ตัว แต่ละตัวได้รับ metacercaria จำนวน 50 เม็ด โดยผ่านหลอดบ้วนทางปาก หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ทำการเมตตาฆาต โดยทำการสลบหนูด้วย Nembutal แบบเกินขนาดจนหลับสนิท แล้วทดสอบการรับความเจ็บปวดของหนูแฮมสเตอร์ โดยการจิกเท้าหนูแล้ว ไม่มีการตอบสนอง จึงเริ่มการผ่าเก็บตัวอย่าง เก็บตับทำการฉีกเนื้อตับเพื่อเอาเฉพาะตัวพยาธิที่สมบูรณ์มาทดสอบต่อไป โดยจะใช้พยาธิระยะ 4 สัปดาห์เป็นตัวแทนของพยาธิระยะโตเต็มวัย ใช้พยาธิจำนวน 10 ตัว/ช่วงการสังเกต/กลุ่ม นำพยาธิ incubate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ที่เติม antibiotic drug (penicillin G, 50 IU/ml; Gentamycin 10 µg/ml, (Gibco)) และสารทดสอบชนิดอื่น ๆ (รายละเอียดอยู่ในตารางที่ 2.3) ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศอิมมัวและมี 5% carbon dioxide ตรวจสอบการเคลื่อนไหวของพยาธิและการรอดชีวิตของพยาธิที่ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12 และ 24 เรียงตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาบันทึกหาค่า % relative motility และ % survival index จากสมการด้านล่าง โดยค่าความสัมพันธ์ (P-value < 0.05 ถือว่ามีระดับนัยสำคัญทางสถิติ) ข้อมูลจะถูกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติ analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS ทำการทดสอบซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง หลังจากทดลองเสร็จให้นำพยาธิไปผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

ตารางที่ 2.3 การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะ 4 สัปดาห์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

กลุ่มที่		จำนวนพยาธิระยะ NEJs ในแต่ละช่วงการสังเกต				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Control (-)		10	10	10	10	10
Vehicle (0.1% DMSO)		10	10	10	10	10
PCZ ($\mu\text{g/ml}$)	0.1	10	10	10	10	10
	1	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10
PB ($\mu\text{g/ml}$)	0.1	10	10	10	10	10
	1	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10
cPI ($\mu\text{g/ml}$)	0.1	10	10	10	10	10
	1	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10
	100	10	10	10	10	10

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนไหว (% relative motility) และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของพยาธิ (% Survival index) (ที่มาจาก Kiuchi et al., 1987; Lorsuwannarat et al., 2013) สมการเหมือนในที่อธิบายใน 2.6.1 แต่มีข้อแตกต่างที่เกณฑ์การเคลื่อนไหวของพยาธิ

เกณฑ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ ระยะ 4 สัปดาห์ ประยุกต์จาก Saowakon et al (2009)

3 = เคลื่อนไหวทุกส่วนของร่างกาย

2 = เคลื่อนไหวบางส่วนของร่างกาย

1 = ไม่ขยับหรือไม่เคลื่อนไหว แต่ไม่ตาย เนื่องจากไม่ติดสี 1 % methylene blue ซึ่งใช้เป็นตัวยืนยันทดสอบการตาย

0 = ไม่ขยับหรือไม่เคลื่อนไหวและตาย เนื่องจากติดสี 1 % methylene blue

2.6.3 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบของรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในสัตว์ทดลอง

หนูแฮมสเตอร์เพศผู้ พันธุ์ golden Syrian อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 54 ตัวแบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม (6 ตัว/กลุ่ม) โดยแต่ละตัวได้รับ metacercaria จำนวน 50 เม็ด โดยผ่านหลอดป้อนทางปาก หลังจากนั้น 5 วัน ป้อนสารสกัดหรือยาที่นำมาทดสอบ ฆ่าหนูในวันที่ 28 หลังป้อนพยาธิ (ตารางที่ 2.4) โดยทำการสลบหนูด้วย Nembutal แบบเกินขนาดจนหลับสนิท แล้วทดสอบการรับความเจ็บปวดของหนูแฮมสเตอร์ โดยการจิกเท้าหนูแล้ว ไม่มีการตอบสนอง จึงเริ่มการผ่าเก็บตัวอย่าง เก็บตับ หาค่าเฉลี่ยของจำนวนพยาธิในแต่ละกลุ่ม นำมาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การป้องกันการติดเชื้อพยาธิ ดังสมการต่อไปนี้

ตารางที่ 2.4 การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรต่อการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้
 ตับ *O. viverrini* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

กลุ่มที่		จำนวนสัตว์ทดลองในกลุ่ม
Control (parasites only)		6
Negative (distilled water)		6
Vehicle (0.1% DMSO)		6
PZQ (mg/Kg)	10	6
	100	6
PB (mg/Kg)	10	6
	100	6
cPI (mg/Kg)	10	6
	100	6

$$\% \text{ protection} = \frac{(\text{จำนวนพยาธิในกลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนพยาธิในกลุ่มทดสอบ}) \times 100}{\text{จำนวนพยาธิในกลุ่มควบคุม}}$$

นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบผลของสารทดสอบชนิดต่าง ๆ ต่อป้องกันการติดเชื้อพยาธิ โดยใช้โปรแกรม SPSS แสดงผลในรูปแบบตารางแจกแจงความถี่ ร้อยละ ค่าความสัมพันธ์ (P-value < 0.05 ถือว่ามีระดับนัยสำคัญทางสถิติ) ข้อมูลจะถูกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติ analysis of variance (ANOVA)

บทที่ 3

ผลการวิจัย

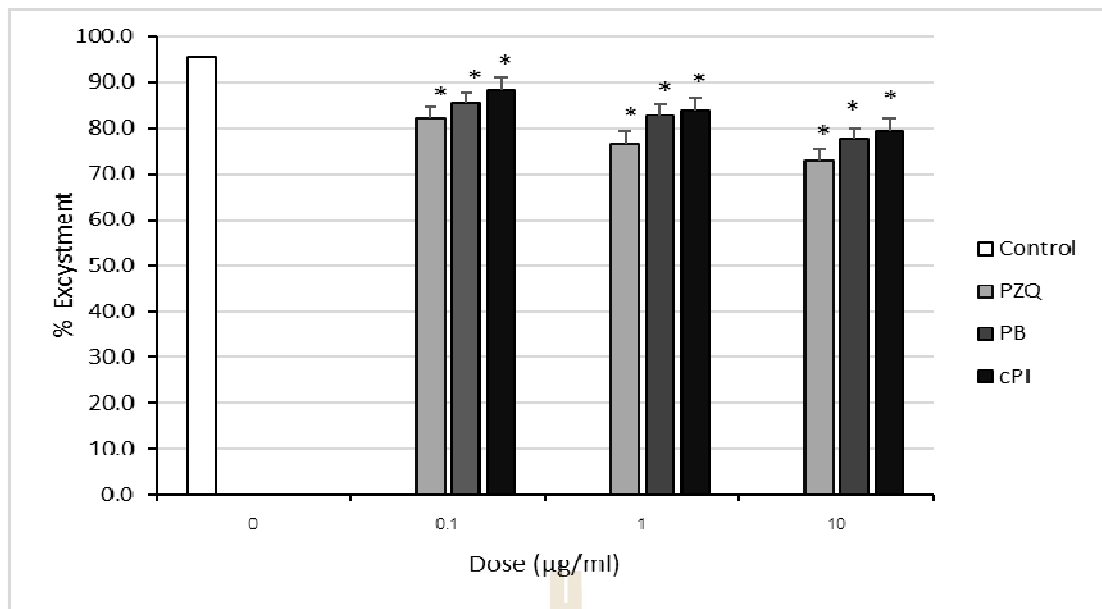
ผลการวิจัย

3.1 สารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง

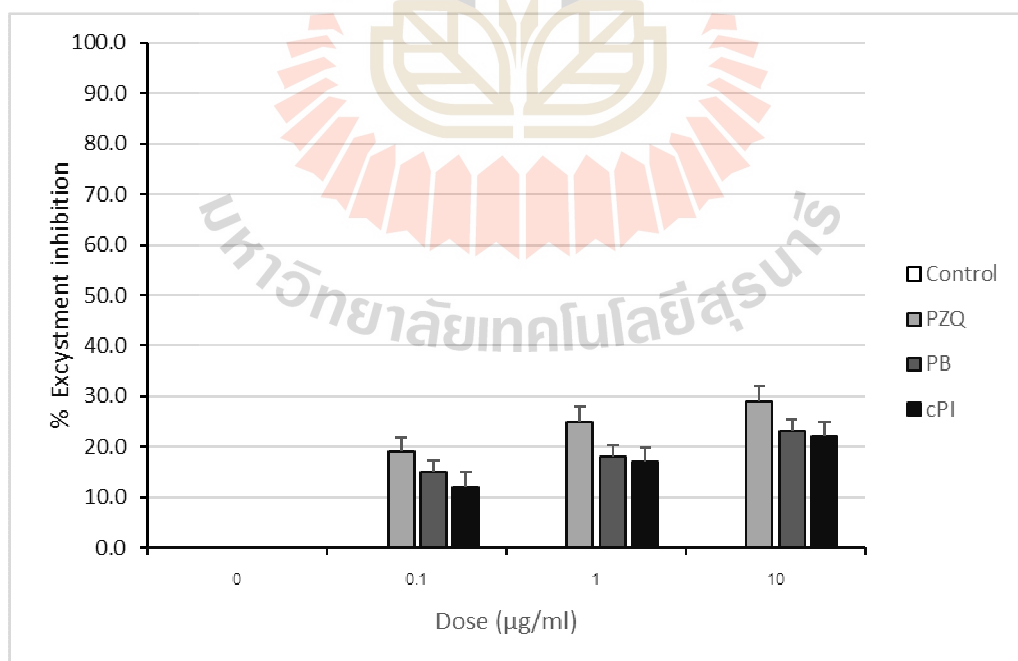
หลังจากคำนวณหาค่า % yield ของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงเท่ากับ 9.20 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักของรากเริ่มต้น 100 g

3.2 การศึกษาการยับยั้งการฟักตัวของพยาธิออกจากเปลือกซิสต์ (excystment inhibition)

การหาค่าเฉลี่ยของการฟักตัวของพยาธิออกจากซิสต์ของแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่มควบคุมมีอัตราการฟักตัวออกจากซิสต์เป็น 95.6 % ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PZQ, PB และ cPI มีร้อยละการฟักตัวลดลงตามลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปหามาก โดยกลุ่มที่ได้รับยา PZQ ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ มีร้อยละการฟักตัวเท่ากับ 81.9%, 76.6% และ 72.7% ซึ่งกลุ่มที่ได้รับ PB มีร้อยละการฟักตัวเท่ากับ 85.5%, 82.8%, 77.5% ขณะที่กลุ่มที่ได้รับ cPI มีร้อยละการฟักตัวเท่ากับ 88.4%, 83.8% และ 79.4% เรียงตามลำดับความเข้มข้นน้อยไปหามาก ซึ่งจะเห็นว่ากลุ่มที่ได้รับ PZQ , PB และ cPI มีผลต่อการฟักตัวของพยาธิเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3.1) และทุกความเข้มข้นของ PZQ ส่งผลต่อการฟักตัวของพยาธิมากกว่าทั้ง PB และ cPI เรียงตามลำดับความเข้มข้น เมื่อเทียบผลการยับยั้งการฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ โดยหาค่า % excystment inhibition พบว่ากลุ่มที่ได้รับยา PZQ มีค่า % excystment inhibition เท่ากับ 19%, 25% และ 29% เรียงตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก ขณะที่พยาธิกลุ่มที่ได้รับสาร PB และ cPI พบว่ามีค่า % excystment inhibition ต่ำกว่ากลุ่มพยาธิที่ได้รับ PZQ ที่ทุกความเข้มข้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งค่า % excystment inhibition ของ PB (15%, 18%, 24%) และ cPI (12%, 17%, 22%) ไม่แตกต่างกันทุกความเข้มข้น (รูปที่ 3.2) เมื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิต 50% (ED_{50}) ของ PZQ เท่ากับ 8.1 $\mu\text{g/ml}$. ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ cPI และ PB มีค่า ED_{50} เท่ากับ 9.6 และ 10.8 $\mu\text{g/ml}$ เรียงตามลำดับ



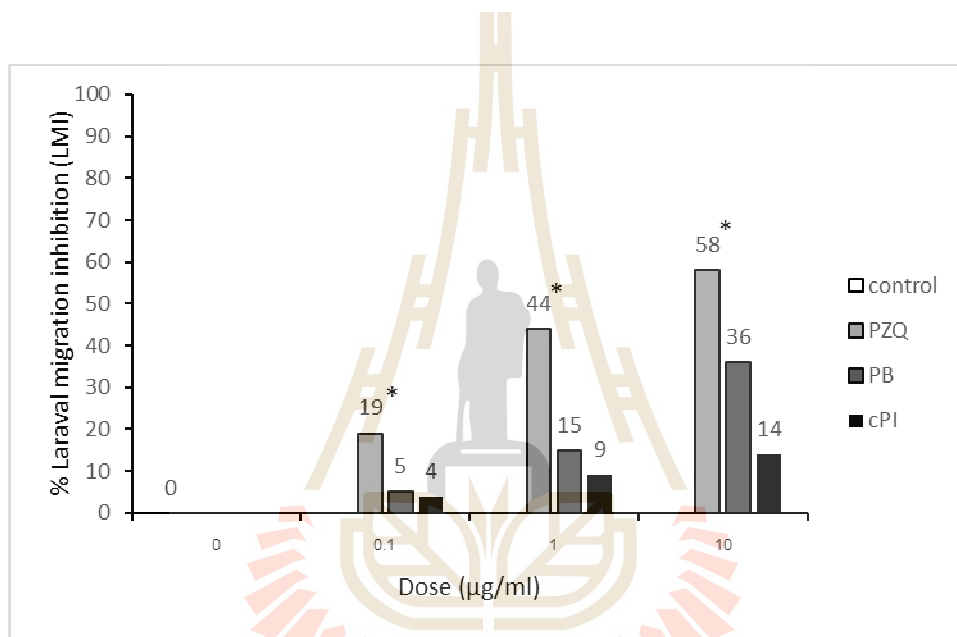
รูปที่ 3.1 ร้อยละของการฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในสารละลาย Tyrode's ที่มีเอนไซม์ 0.2% trypsin ผสมในน้ำเกลือที่มี 0.1% DMSO (Control) และกลุ่มที่มีสารทดสอบ PZQ, PB และ cPI พบว่าพยาธิฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ในทุกกลุ่มได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($*P < 0.05$; $n=40$) และที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ของพยาธิในกลุ่มที่ได้รับยา PZQ < PB < cPI เรียงตามลำดับความเข้มข้น



รูปที่ 3.2 ร้อยละของการยับยั้งการฟักตัวออกจากเปลือกซิสต์ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* พบว่าพยาธิที่ได้รับ PZQ มีการยับยั้งการฟักตัวของพยาธิมากที่สุดทุกความเข้มข้น ($* P < 0.05$; $n=40$)

3.3 การศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่พยาธิใบไม้ตับผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ ด้วยวิธี modified migration inhibition

ความเข้มข้นของสารที่ทดสอบทั้งสามชนิด ในการศึกษาการเคลื่อนที่ของพยาธิผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ เริ่มต้นที่ 0.1, 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้มีการยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์สูงสุดเพียง 58% (รูปที่ 3.3) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า PZQ ยับยั้งการเคลื่อนที่ผ่านแผ่นกรองเท่ากับ 19%, 44% และ 58% โดยมีค่าสูงกว่าพยาธิในได้รับ PB (5%, 15%, 36%) และ cPI (4%, 9%, 14%) เรียงตามลำดับความเข้มข้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PZQ ผลต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ ให้ผลดีที่สุด โดยมีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งมีความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ (IC_{50}) ของ PZQ เท่ากับ 1.63 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ PB และ cPI มีค่าเท่ากับ 1.43 และ 8.8 $\mu\text{g/ml}$ เรียงตามลำดับ



รูปที่ 3.3 ร้อยละของการยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ พยาธิที่ได้รับ PZQ มีการยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิมากที่สุดทุกความเข้มข้น โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $P < 0.05$; $n=40$)

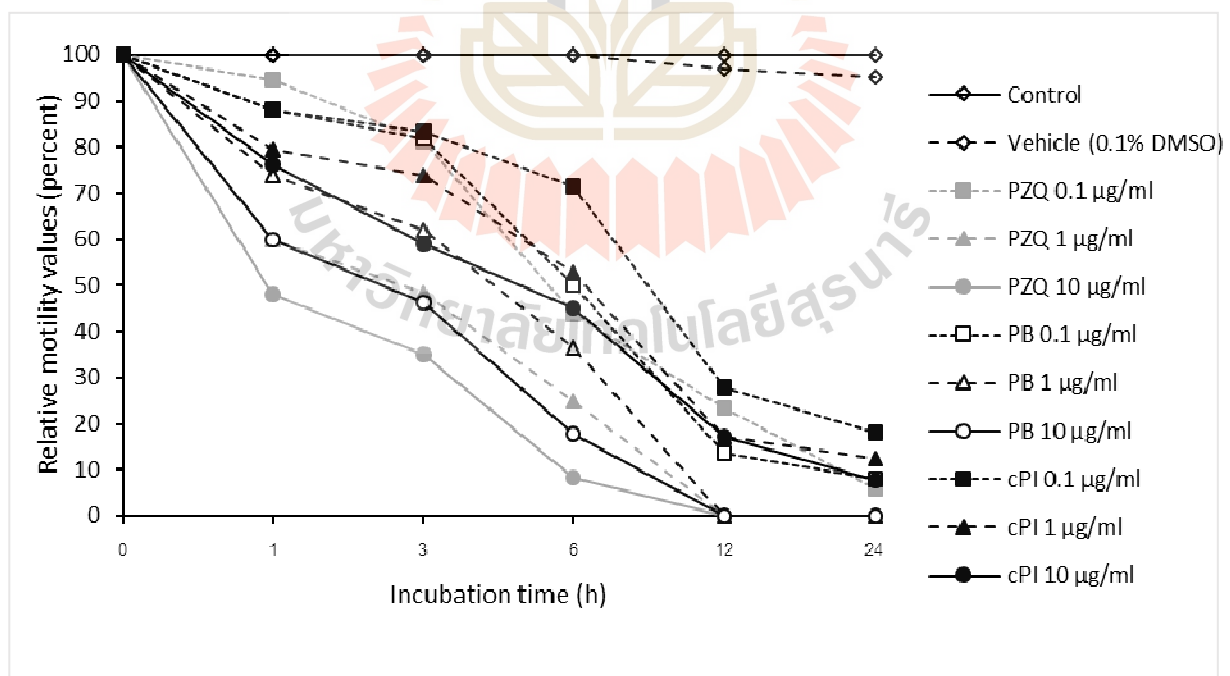
3.4 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบของรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะ NEJs ในหลอดทดลอง

เมื่อทดสอบสารทั้ง PZQ, PB, cPI เทียบกับ กลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle ที่มี 0.1% DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อพยาธิ (RPMI-1640) สังเกตการเคลื่อนไหวและการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิที่ 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.1 และ รูปที่ 3.4) พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (relative motility-RM values) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงการทดลองชั่วโมงที่ 24 (RM value = 100%) ในขณะที่กลุ่ม vehicle มีการเคลื่อนไหวลดลงเพียง 5% (RM value = 95%) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งถือว่ายอมรับได้ว่า 0.1% DMSO ไม่ได้ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิในระยะ NEJs ส่วนกลุ่ม positive control คือยาที่ใช้ท้องตลาดในการ

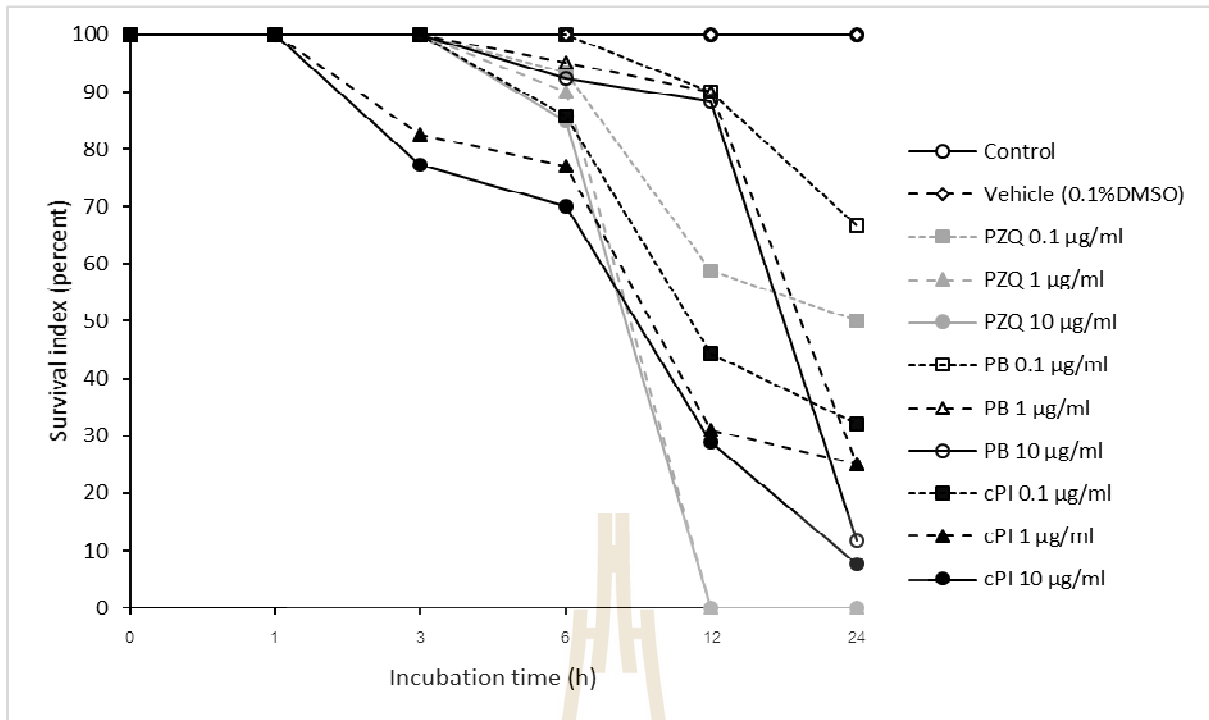
ทดลองนี้ใช้ PZQ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1, 1 และ 10 µg/ml เป็น positive control เทียบผลกับ PB และ cPI ซึ่งพบว่า PZQ มีผลต่อค่า RM value มากกว่า PB และ cPI เมื่อเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกันและเวลาเดียวกัน โดย PZQ ที่ความเข้มข้น 0.1 µg/ml มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง RM value ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-3 เป็นต้นไป แต่พยาธิส่วนใหญ่ยังไม่ตาย โดยดูจากค่าดัชนีการรอดตาย (survival index: SI) มีค่าเท่ากับ 100% (รูปที่ 3.5) ค่า RM value ลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป (RM =44%, SI = 93%) และค่า RM ลดลงต่อเนื่องจากชั่วโมงที่ 12 และ 24 (RM=24%, SI =59% และ RM=4%, SI = 50% ตามลำดับ) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PZQ เท่ากับ 1 และ 10 µg/ml พบว่าค่า RM ต่ำกว่า 70% ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-3 และการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงเรื่อย ๆ อย่างต่อเนื่อง แต่พยาธิทั้งหมดยังมีชีวิตอยู่ (SI=100%) โดยชั่วโมงที่ 6 ทั้งสองความเข้มข้น มีค่า RM ต่ำกว่า 30% (RM =25%, SI =95% และ RM = 8%, SI=85% ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml) และไม่มีการเคลื่อนไหวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป (RM= 0%, SI =0%) ส่วนพยาธิที่แช่ใน PB พบว่ามีการเคลื่อนไหวลดลง รูปแบบเหมือนกับพยาธิที่ได้รับ PZQ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (0.1 µg/ml) โดยมีค่า RM เท่ากับ 88% และ 82% ในขณะที่ SI=100% ทั้งสองช่วงเวลาในชั่วโมงที่ 1 และ 3 แม้ว่าที่ชั่วโมงที่ 6 พยาธิมีค่า RM = 50% แต่พยาธิไม่ตาย (SI=100%) จนกระทั่งเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 พบว่าพยาธิมีการตายประมาณ 10-30% (RM= 14%,SI =90% และ RM =8%,SI =67% เรียงตามระยะเวลา) จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ของ PB มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิเช่นเดียวกับ PZQ โดยส่งผลกระทบต่อเคลื่อนไหวตั้งแต่ชั่วโมงแรกต่อเนื่องไปยังชั่วโมงที่ 6 เริ่มพบการตายของพยาธิและพยาธิทั้งหมดหยุดการเคลื่อนไหวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป ซึ่งพบว่ามี การตายตั้งแต่ 10% (RM =0%, SI =90% และ RM =0%, SI =88%) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าพยาธิมีชีวิตรอดเหลือเพียง 12-25% เท่านั้น ในส่วนพยาธิที่แช่ใน cPI นั้นมีผลต่อค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิน้อยกว่าทั้ง PZQ และ PB โดยที่ความเข้มข้น 0.1 µg/ml มีผลต่อการเคลื่อนไหวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 -3 เช่นเดียวกับ PZQ โดยพบว่า cPI ค่อย ๆ ลดการเคลื่อนไหวของพยาธิจากชั่วโมงที่ 1-6 โดยค่า RM value เท่ากับ 88%, 83% และ 71% เรียงตามลำดับ ซึ่งพบว่าพยาธิเริ่มมีการตายประมาณ 14% (SI=86%) ที่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงอย่างรวดเร็วที่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 ส่งผลให้การรอดชีวิตของลดต่ำกว่า 50% (RM=28%, SI=44% และ RM=18%, SI=32%) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ cPI เป็น 1 และ 10 µg/ml พบว่าค่า RM value ลดลงอย่างรวดเร็วอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 3 (RM= 74%, 59% เรียงลำดับตามความเข้มข้น) และเริ่มพบการตายของพยาธิ (SI=83%, 77% เรียงลำดับตามความเข้มข้น) พยาธิมีการร่อนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงที่ 12 (SI=31% และ 29%) และชั่วโมงที่ 24 (SI=25% และ 8%) แม้จะมีค่า RM value ใกล้เคียงกัน (RM=17%,17% และ 13%,8%) เรียงตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 ค่าร้อยละความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว RM values (%) ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะ NEJs ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบยา PZQ, PB และ cPI ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

กลุ่ม	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)					
		0	1	3	6	12	24
ควบคุม		100	100	100	100	100	100
Vehicle	0.1% DMSO	100	100	100	100	97	95
PZQ							
	0.1	100	95	81	44	24	6
	1	100	60	48	25	0	0
	10	100	48	35	8	0	0
PB							
	0.1	100	88	82	50	14	8
	1	100	74	62	36	0	0
	10	100	60	46	18	0	0
cPI							
	0.1	100	88	83	71	28	18
	1	100	79	74	53	17	13
	10	100	76	59	45	17	8

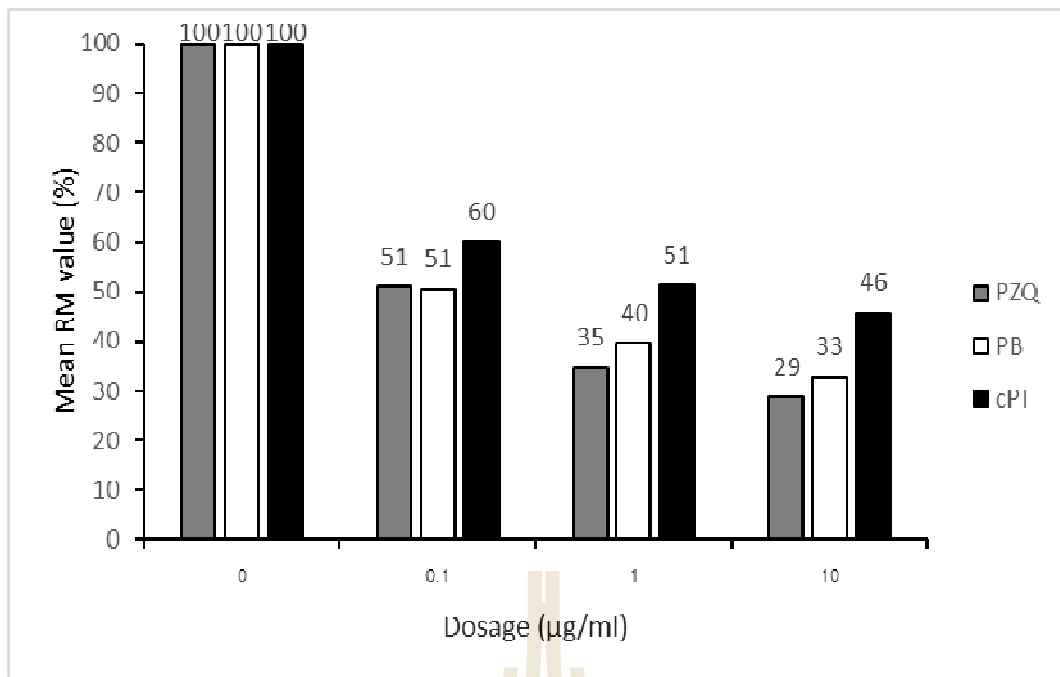


รูปที่ 3.4 ร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ NEJs พยาธิที่ได้รับ PZQ มีการยับยั้งการเคลื่อนไหวที่ของพยาธิมากที่สุดทุกความเข้มข้น โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (* $P < 0.05$; $n=30$)

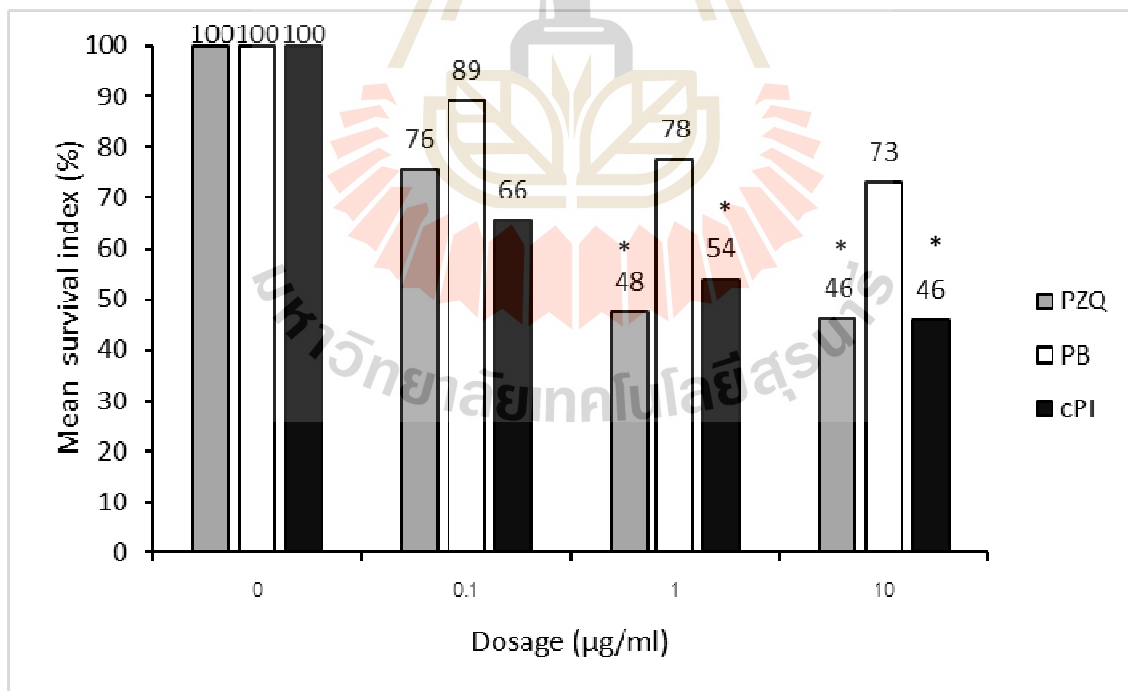


รูปที่ 3.5 ร้อยละดัชนีการรอดของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ NEJs พยาธิที่ได้รับ PZQ มีการรอดน้อยที่สุดทุกความเข้มข้น โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (* $P < 0.05$; $n=30$)

เมื่อนำผลค่าเฉลี่ยของ RM value ของสารทั้งสามอย่างมาเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้น แม้ว่า PZQ ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิมากที่สุด รองลงมาคือ PB และ cPI เรียงตามลำดับ (รูปที่ 3.6) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่า SI ของ cPI กับ PZQ และ PB (รูปที่ 3.7) พบว่า แม้ค่า RM value ของกลุ่มที่ได้รับ PZQ จะต่ำกว่ากลุ่ม cPI ทุกความเข้มข้น แต่ค่า SI ของกลุ่มที่ได้รับ cPI ต่ำกว่า PZQ ที่ความเข้มข้น 0.1 µg/ml และเท่ากับกลุ่ม PZQ ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ถึงแม้จะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า cPI มีผลเทียบเคียงกับ PZQ ในพยาธิระยะ NEJs นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตว่า ถึงแม้ค่า RM value ในกลุ่ม PB ใกล้เคียงกับกลุ่ม PZQ แต่ค่า SI สูงกว่าทั้ง PZQ และ cPI โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml จากผลการทดลองสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน cPI มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิระยะ NEJs เทียบเคียงกับ PZQ และดีกว่า PB เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ PZQ ที่ยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 2.55 µg/ml ในขณะที่ IC_{50} ของ PB เท่ากับ 2.87 µg/ml และ IC_{50} ของ cPI เท่ากับ 3.55 µg/ml เรียงตามลำดับ



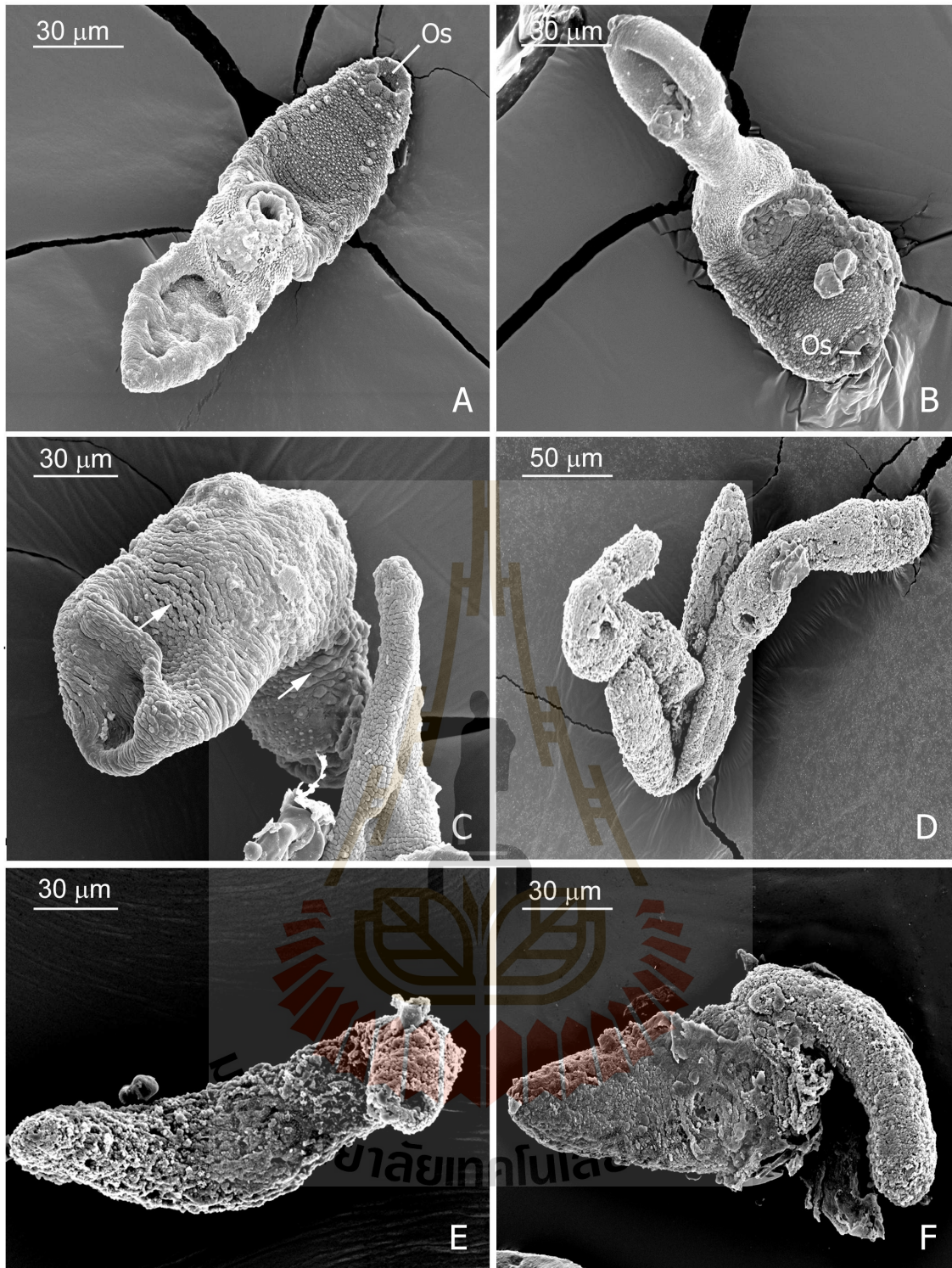
รูปที่ 3.6 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ NEJs พยาธิที่ได้รับ PZQ มีการยับยั้งการเคลื่อนไหวที่ของพยาธิมากที่สุดทุกความเข้มข้น รองลงมาคือ PB และ cPI เมื่อเปรียบเทียบระหว่างทั้งสามกลุ่มในความเข้มข้นเดียวกันพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $P < 0.05$; n=5)



รูปที่ 3.7 ค่าเฉลี่ยร้อยละดัชนีการรอดของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ NEJs พยาธิที่ได้รับ cPI มีค่าเฉลี่ยการรอดน้อยที่สุดทุกความเข้มข้น รองลงมาคือ PZQ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ PB ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml (* $P < 0.05$; n=5)

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิหลังทดสอบสารทั้งสามชนิด ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดพบว่าพยาธิในกลุ่ม vehicle (0.1% DMSO) มีโครงสร้างไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 3.8, A และ B) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวพยาธิส่วนใหญ่เริ่มจากการบวมของผิว แล้วตามมาด้วยการมีตุ่มพองและตุ่มพองแตก จนเกิดเป็นแผลเปิด เกิดพยาธิสภาพที่ผิว สุดท้ายผิวพยาธิจะหลุดลอก ในการทดสอบนี้ก็เช่นเดียวกันพบว่าพยาธิในกลุ่มที่ได้รับ PZQ ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ มีลักษณะเป็นตุ่มพองที่บริเวณลำตัว (รูปที่ 3.8, C) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น PZQ เป็น 1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีการหลุดลอกของผิวพยาธิทั้งตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 3.8, D) ส่วนพยาธิในกลุ่มที่ได้รับ PB ความเข้มข้น 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 12 ชั่วโมง (รูปที่ 3.8, E และ F) มีผิวหลุดลอกเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ PZQ





รูปที่ 3.8 ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ NEJs หลังจากได้รับสารต่าง ๆ (A) กลุ่มควบคุม, (B) กลุ่ม vehicle (0.1% DMSO), (C) กลุ่มที่ได้รับ PZQ ความเข้มข้น 0.1 µg/ml มีผิวหนังบวมที่กลางลำตัว (ลูกศร) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1 µg/ml มีการหลุดลอกของผิวหนังพยาธิทั้งตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (D) ส่วนพยาธิในกลุ่มที่ได้รับ PB ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ที่ 12 ชั่วโมง (E และ F) มีผิวหลุดลอกเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ PZQ

3.5 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบของรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง

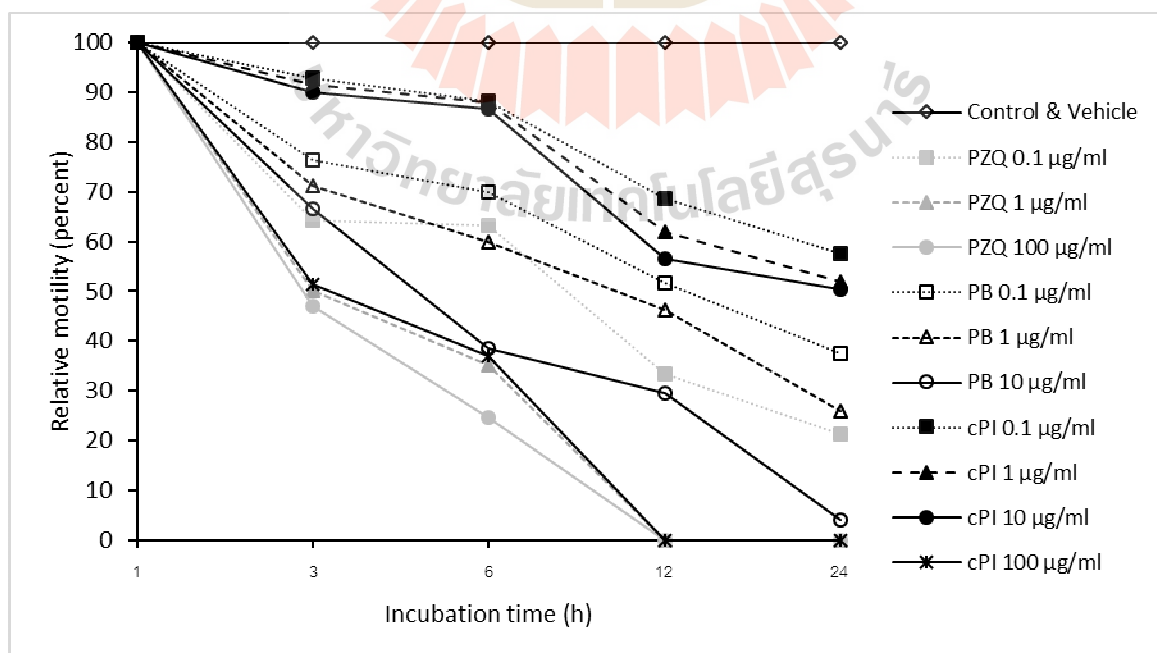
ผลการเปรียบเทียบของค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (relative motility - RM values) ของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* ระยะ 4 weeks ที่แช่ใน PZQ, PB และ cPI ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.9) พบว่าพยาธิในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle เคลื่อนไหวดีทุกตัว จนสิ้นสุดชั่วโมงที่ 24 ดังนั้น DMSO ไม่ส่งผลต่อการทดลอง ส่วนกลุ่มอื่น ๆ ที่ได้รับสารหลังจากผ่านไป 3 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ได้รับ PZQ มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิมากกว่ากลุ่ม PB และ cPI โดยแปรผันตามกับความเข้มข้นและระยะเวลา แม้ว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-6 พยาธิที่แช่ใน PZQ ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ มีการเคลื่อนไหวลดลง (RM = 64%) แต่ไม่พบการตายของพยาธิ SI = 100% (รูปที่ 3.10) หลังจากนั้นการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไปและพบว่าการตายของพยาธิประมาณ 40% เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า พยาธิมีการรอดชีวิตเพียง 50% เท่านั้น ในขณะที่ PZQ ความเข้มข้น 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ มีผลลดการเคลื่อนไหวของพยาธิอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 (RM = 50%, 47%) และการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 6 แล้วไม่พบการเคลื่อนไหวของพยาธิหลังจาก 12 ชั่วโมงที่แช่ใน PZQ เมื่อตรวจสอบการรอดชีวิตพบว่าพยาธิตายหมด (SI = 0%, 0%) ตามลำดับ

ส่วนพยาธิที่ได้รับ PB ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ส่งผลลดการเคลื่อนไหวของพยาธิเพียง 30% เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง (RM = 70%) เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 12 และ 24 ชั่วโมงทำให้การเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงเป็นลำดับ แม้พยาธิเคลื่อนไหวช้าลงจนไม่เคลื่อนไหว แต่พบการตายของพยาธิเพียง 17% เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (SI = 95%, 83%) ส่วนพยาธิที่แช่ใน PB ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ แต่มีผลต่อการเคลื่อนไหวมากกว่า พบว่าในชั่วโมงที่ 12 และ 24 มีค่า RM เท่ากับ 46% และ 28% เรียงตามลำดับ เมื่อตรวจสอบการรอดชีวิตพบว่ามีเพียง 56% เท่านั้น หลังจากสังเกตการเคลื่อนไหวของพยาธิที่แช่ใน PB 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าพยาธิบางตัวเริ่มการเคลื่อนไหวบางส่วนและบางตัวไม่เคลื่อนไหวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3-6 (RM = 67%, SI = 100% และ RM = 38%, SI = 92%) จนเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 และชั่วโมงที่ 24 พยาธิเกือบทั้งหมดไม่มีการเคลื่อนไหวและมีการรอดชีวิตเพียง 12%

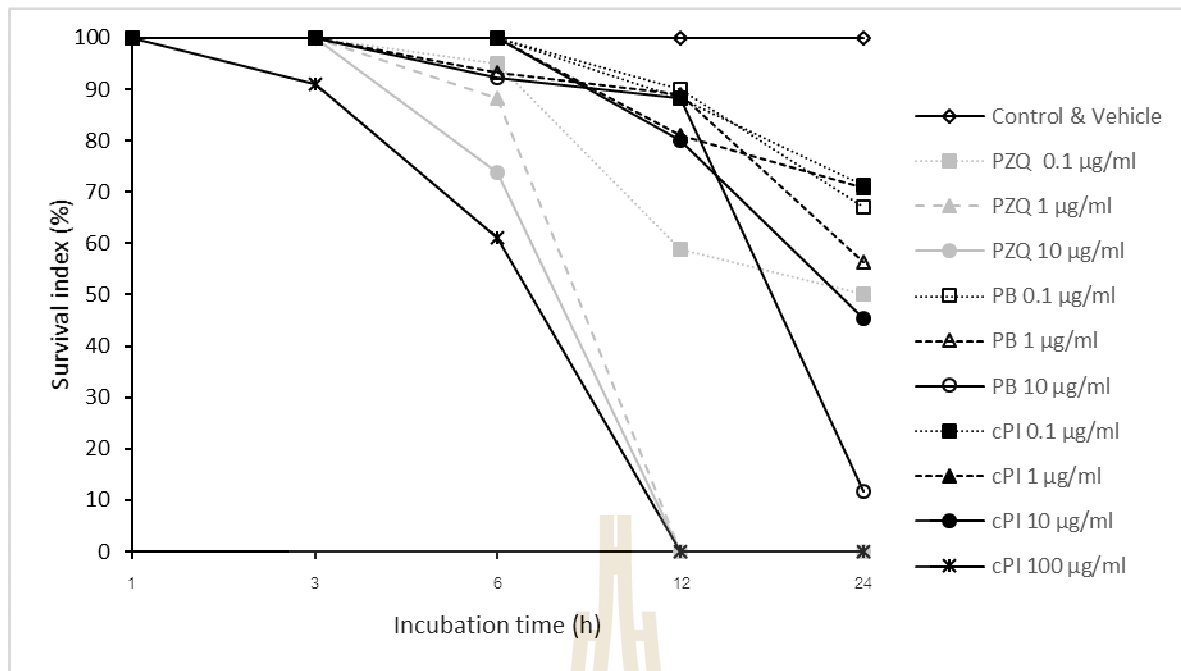
พยาธิที่แช่ใน cPI ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ค่อยส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิทุกช่วงการสังเกต เมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 24 พบว่าค่า RM เท่ากับ 58% และ 52% เรียงตามลำดับความเข้มข้น และการรอดชีวิตสูงถึง 70% สรุปได้ว่าความเข้มข้น 0.1 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิ ส่วนพยาธิที่แช่ใน cPI ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ค่อย ๆ ลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3-6 และชั่วโมงที่ 24 พบว่าพยาธิมีค่า RM เท่ากับ 50% และ SI เท่ากับ 45% ผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มว่าพยาธิที่แช่ในความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ จะพบว่าการตายเมื่อไหร่ ผลปรากฏว่าพยาธิเริ่มตายในชั่วโมงที่ 3 (SI = 91%) และมีการรอดชีวิตที่ 50% ที่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นพยาธิตาย 100%

ตารางที่ 3.2 ค่าร้อยละความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว RM values (%) ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะ 4 สัปดาห์ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบยา PZQ, PB และ cPI ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

กลุ่ม	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)					
		0	1	3	6	12	24
ควบคุม		100	100	100	100	100	100
Vehicle	0.1% DMSO	100	100	100	100	100	100
PZQ							
	0.1	100	100	64	63	33	21
	1	100	100	50	35	0	0
	10	100	100	47	25	0	0
PB							
	0.1	100	100	76	70	52	38
	1	100	100	71	60	46	26
	10	100	100	67	38	29	4
cPI							
	0.1	100	100	93	88	69	58
	1	100	100	92	88	62	52
	10	100	100	90	87	57	50
	100	100	100	52	37	0	0

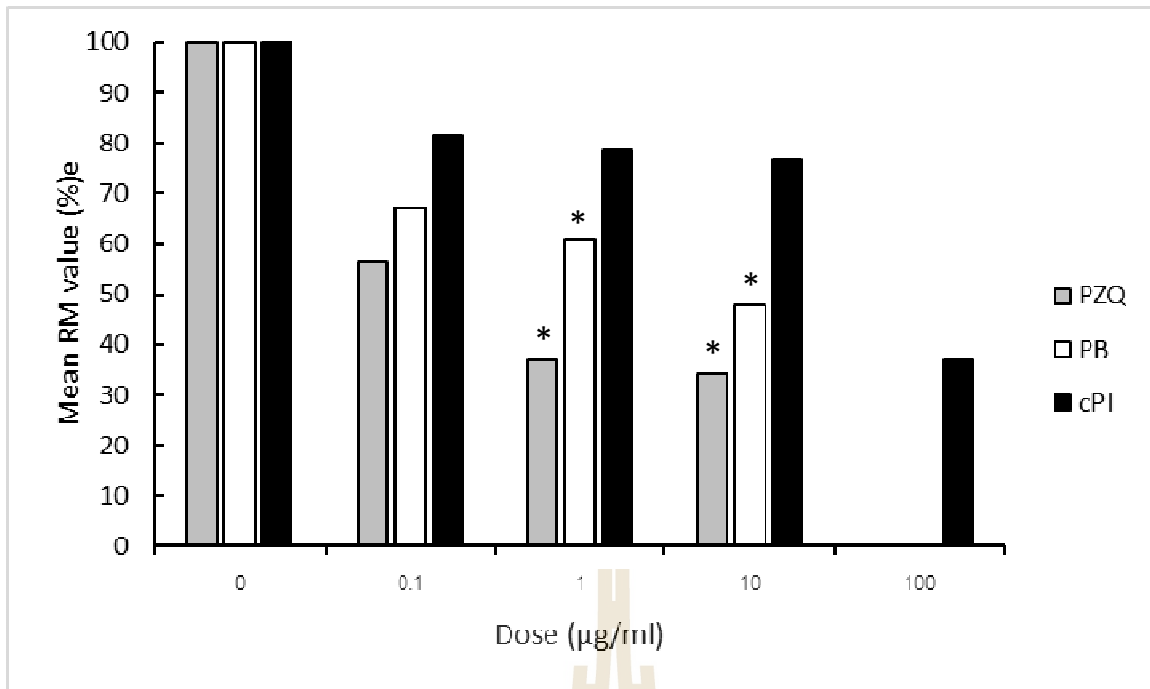


รูปที่ 3.9 ร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ 4 สัปดาห์ พยาธิที่ได้รับ PZQ มีการยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิมากที่สุดทุกความเข้มข้น (n=10)

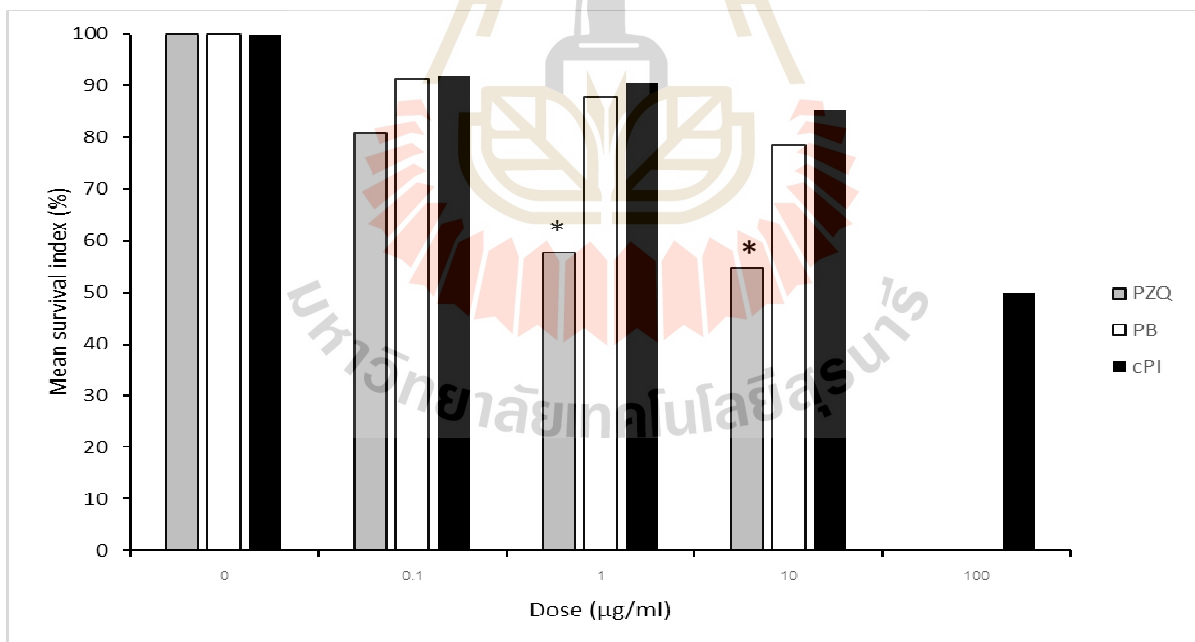


รูปที่ 3.10 ร้อยละดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* 4 สัปดาห์ พยาธิที่ได้รับ PZQ ที่ 0.1 µg/ml ที่ 24 ชั่วโมงมีการรอดเพียง 50% ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PB และ cPI ต้องใช้ความเข้มข้นเป็น 1 และ 10 µg/ml จึงทำให้การรอดชีวิตของพยาธิใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับ PZQ ที่ 0.1 µg/ml (n=10)

เมื่อนำผลค่าเฉลี่ยของ RM value ของสารทั้งสามอย่างมาเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้น แม้ว่า PZQ ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิมากที่สุด รองลงมาคือ PB และ cPI เรียงตามลำดับ (รูปที่ 3.11) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เฉพาะที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย SI ของ cPI กับ PZQ และ PB (รูปที่ 3.12) พบว่า ค่า SI ของกลุ่มที่ได้รับ PZQ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เฉพาะที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับค่า RM เป็นที่น่าสังเกตว่า แม้ค่า RM value ของพยาธิกลุ่มที่ได้รับ PB จะต่ำกว่ากลุ่ม cPI ทุกความเข้มข้น แต่ค่า SI ของทั้งสองกลุ่มที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PZQ มีผลต่อการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับระยะ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ PB มีผลต่อการเคลื่อนไหว แต่ไม่ส่งผลต่อการตายของพยาธิที่ความเข้มข้นเดียวกัน เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ PZQ ที่ยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 2.37 µg/ml ในขณะที่ IC_{50} ของ PB เท่ากับ 2.90 µg/ml และ IC_{50} ของ cPI เท่ากับ 5.02 µg/ml เรียงตามลำดับ



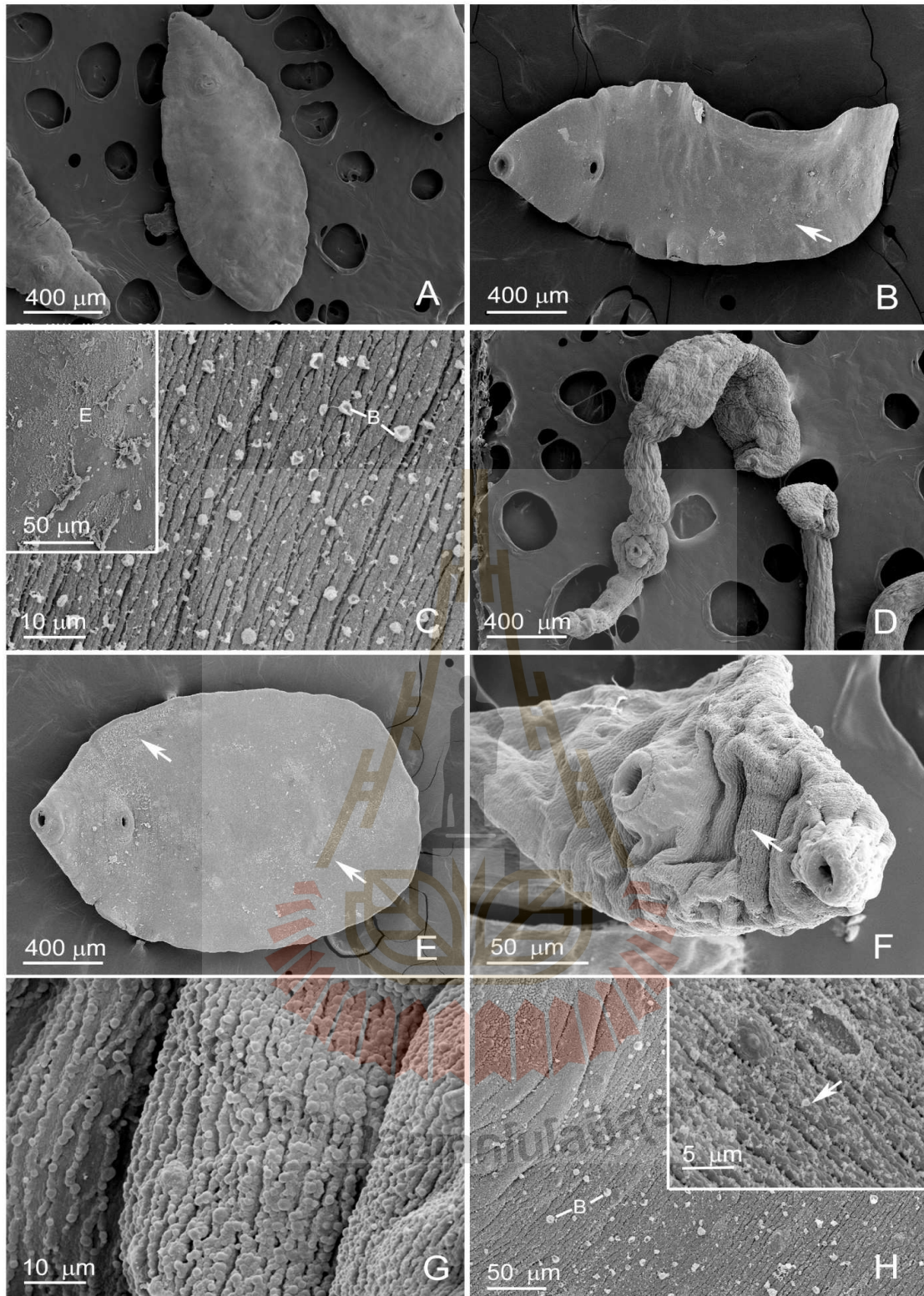
รูปที่ 3.11 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ 4 สัปดาห์ พยาธิที่ได้รับ PZQ มีการยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิมากที่สุดทุกความเข้มข้น รองลงมาคือ PB และ cPI เมื่อเปรียบเทียบระหว่างทั้งสามกลุ่มในความเข้มข้นเดียวกันพบว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml PZQ และ PB มีผลการเคลื่อนไหวของพยาธิ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $P < 0.05$; n=5)



รูปที่ 3.12 ค่าเฉลี่ยร้อยละดัชนีการรอดของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ 4 สัปดาห์ พยาธิที่ได้รับ PZQ มีค่าเฉลี่ยการรอดน้อยที่สุดทุกความเข้มข้นและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ PB และ cPI ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml (* $P < 0.05$; n=5) ส่วนการรอดชีวิตพยาธิกลุ่มที่ได้รับ PB และ cPI ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิหลังทดสอบสารทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าพยาธิในกลุ่ม vehicle (0.1% DMSO) มีโครงสร้างไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 3.13, A) ส่วนพยาธิในกลุ่มที่แช่ PZQ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ มีลักษณะเป็นตุ่มพองที่บริเวณระหว่าง oral sucker กับ ventral sucker (รูปที่ 3.13, B และ C) และพบว่าตั้งแต่กลางลำตัวถึงส่วนหางมีการหลุดลอกของผิวพยาธิ (รูปที่ 3.13, ลูกศร และกรอบเล็กในรูป C) เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง พบว่ามีการหลุดลอกของผิวพยาธิบางตัวทั้งตัว จนไม่เห็นทั้ง papillae และหนามของพยาธิ (รูปที่ 3.13, D) ส่วนพยาธิที่แช่ใน PB ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับ PZQ พบว่ามีตุ่มพองกระจายทั่วตัวพยาธิทั้งด้าน ventral และด้าน dorsal เช่นเดียวกับที่เวลา 3 ชั่วโมงของ PZQ แล้วเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 24 พบว่าผิวของพยาธิหลุดลอกจนเห็นโครงสร้างใต้ผิวหนัง และพบตุ่มพองขนาดใหญ่กระจายทั่วบริเวณส่วนหัวระหว่าง oral sucker กับ ventral sucker (รูปที่ 3.13, F และ G) ส่วนพยาธิที่แช่ใน cPI หลังจากผ่านไป 3 ชั่วโมงพบว่ามีตุ่มพองกระจายไปทั่วที่บริเวณ oral sucker กับ ventral sucker และบริเวณตั้งแต่กลางลำตัวลงไปมีตุ่มพองขนาดเล็กกระจายทั่วผิวพยาธิทั้งสองด้าน (รูปที่ 3.13, H)

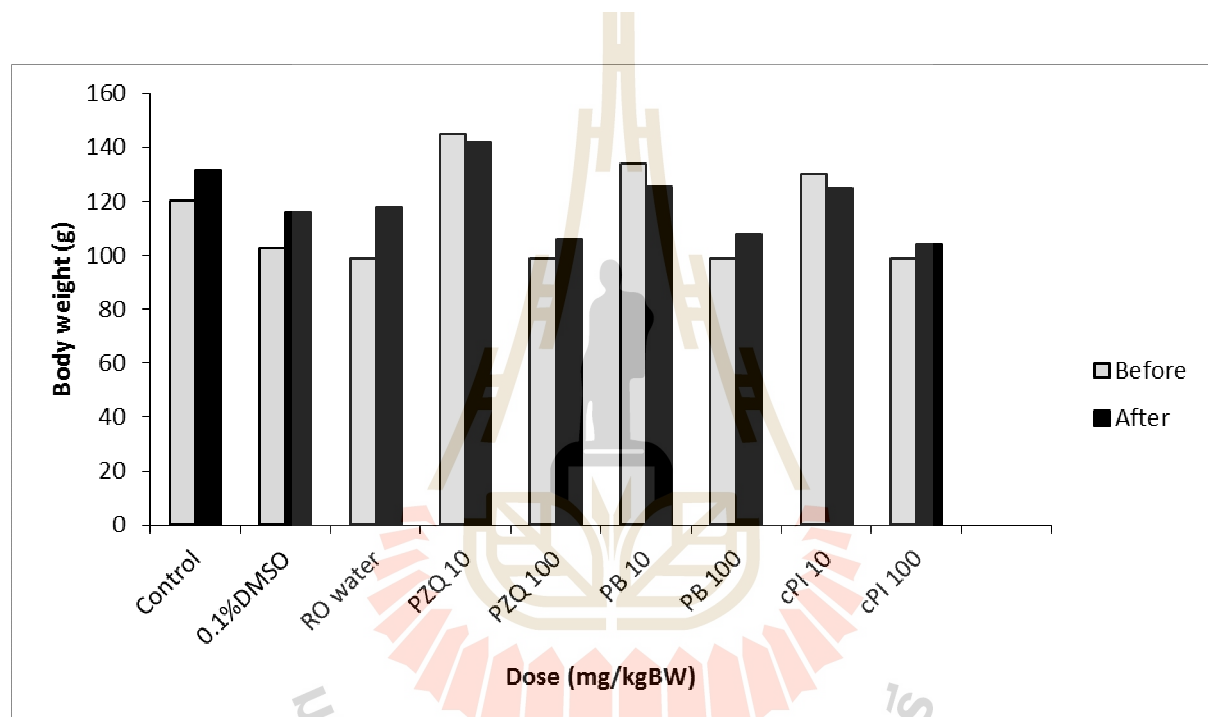




รูปที่ 3.13 ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะ 4 สัปดาห์ หลังจากได้รับสารต่าง ๆ (A) กลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle (0.1% DMSO), (B-C) กลุ่มที่ได้รับ PZQ ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีผิวหนังหลุดลอกที่กลางลำตัวและหาง (ลูกศร) และมีวุ้นตุ่มพอง (bleb: B ที่ส่วนหัวในภาพ C), (D) พยาธิที่ได้รับ PZQ ที่ 24 ชั่วโมงผิวหนังหลุดลอกทั้งตัว, (E-G) พยาธิที่ได้รับ PB เกิดตุ่มพองกระจายทั้งตัวหลังจาก 3 ชั่วโมง (ลูกศร, ภาพ E) และที่ 24 ชั่วโมง (F และ G) ในขณะที่พยาธิที่ได้รับ cPI (ภาพ H) พบตุ่มพองขนาดใหญ่ (bleb: B) และขนาดเล็ก (ลูกศร)

3.6 ศึกษาผลของสารสกัดยาบของรากเจตมูลเพลิงแดงต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในสัตว์ทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพการลดการติดเชื้อพยาธิ โดยดูจากจำนวนพยาธิที่พบหลังให้สารทดสอบไป ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kgBW เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักของหนูทดลองก่อนและหลังให้พยาธิพบว่าหนูในกลุ่มควบคุม (ให้เฉพาะพยาธิ), กลุ่ม negative control (ได้รับน้ำกลั่น RO water) และกลุ่ม vehicle (ได้รับ 0.1% DMSO) มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นประมาณ 10-20 g ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ 10 mg/kgBW ของสารทั้งสามชนิด (PZQ, PB และ cPI) น้ำหนักลดลงประมาณ 10 g เมื่อเทียบกับน้ำหนักก่อนเริ่มการทดลอง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 3.14) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 100 mg/kgBW พบว่าน้ำหนักเพิ่มขึ้นทุกกลุ่ม แต่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม น้ำหนักตัวของหนูในกลุ่ม negative control และกลุ่ม vehicle ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



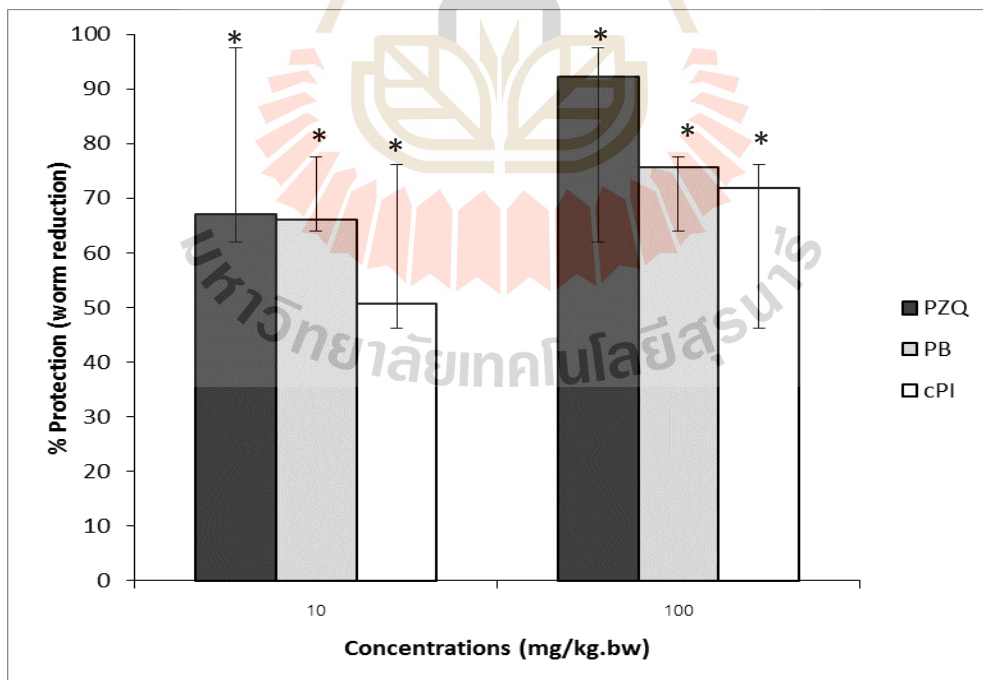
รูปที่ 3.14 น้ำหนักของสัตว์ทดลองหลังจากเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อพยาธิแล้ว ให้สาร PZQ, PC และ cPI เทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle เมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหนักหนูในกลุ่มที่ได้รับสารที่ความเข้มข้น 10 mg/kgBW น้ำหนักลดลงทุกกลุ่ม ในขณะที่หนูได้รับสารที่ทดสอบทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 100 mg/kgBW มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $P < 0.05$; n=6)

หลังจากผ่าเปิดช่องท้องพบว่ากลุ่มควบคุม, กลุ่ม vehicle และกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น มีการเกิดพังผืดที่ตับ (liver fibrosis) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PZQ, PB และ cPI ไม่เกิด fibrosis ทั้งที่ 10 และ 100 mg/kgBW หลังจากนับจำนวนพยาธิในแต่ละกลุ่มการทดลอง แล้วนำมาหาค่าร้อยละการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ (% protection) พบว่าจำนวนพยาธิในกลุ่มในหนูที่ได้รับน้ำกลั่น และกลุ่มที่ได้รับ 0.1% DMSO ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารทั้งสามชนิดมีจำนวนพยาธิน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3.3) ซึ่งแสดงค่า % protection (worm reduction) สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P < 0.05$) (รูปที่ 3.15) กลุ่ม negative control และกลุ่ม vehicle ลดจำนวนพยาธิได้เพียง 2% และ 13% เท่านั้น กลุ่มที่ได้รับ PB และ PZQ ที่ความเข้มข้น 10 mg/kgBW ลดจำนวนพยาธิได้ถึง 66% และ 67% ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ cPI ลดจำนวนพยาธิเพียง 51% ส่วนที่ความเข้มข้น 100 mg/kgBW พบว่ากลุ่มที่ได้รับ PZQ ให้ผลดีที่สุดถึง 92% ในขณะที่ PB และ cPI ให้ผลลดจำนวนพยาธิ 76% และ 72% เรียงตามลำดับ เมื่อเทียบประสิทธิภาพของสารทั้งสามชนิดพบว่า PZQ ลดจำนวนพยาธิได้ดีกว่าทั้ง PB และ cPI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3.3 ค่าเฉลี่ยจำนวนพยาธิใบไม้ตับ หลังจาก ได้รับสารทดสอบทางปาก 4 สัปดาห์

กลุ่มที่	ความเข้มข้นที่ได้รับ (mg/kgBW)		
	0	10	100
Control (parasites only)	28	-	-
Negative (distilled water)	27	-	-
Vehicle (0.1% DMSO)	25	-	-
PZQ	-	10	3
PB	-	9	8
cPI	-	16	9



รูปที่ 3.15 ร้อยละของการลดลงของจำนวนพยาธิหลังได้รับสารทดสอบทางปากที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kgBW ของ PZQ, PB และ cPI เทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่ม vehicle โดยแสดงเป็นค่า mean \pm SD พบว่า PZQ ที่ 100 mg/kgBW สามารถลดพยาธิที่พบในสัตว์ทดลองถึง 92% และดีกว่าทั้ง PB และ cPI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $P < 0.05$, $n=6$)

บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลองและบทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง เทียบกับ plumbagin ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากรากเจตมูลเพลิงแดง ในขณะที่มี PZQ เป็น positive control โดยศึกษาผลของสารดังกล่าวตั้งแต่การฟักออกจากเปลือกไข่พยาธิ, จำลองการเคลื่อนไหวไขผ่านเยื่อสังเคราะห์ ซึ่งเลียนแบบการไขผ่านผนังลำไส้, การเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิที่ระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะตัวแทนของระยะโตเต็มวัยของพยาธิในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิ ซึ่งถือเป็นอวัยวะแรกในการสัมผัสกับสารที่นำมาทดสอบ

ผลของสารสกัดกับการฟักออกจากไข่พบว่าทั้ง PZQ, PB และ cPI ไม่สามารถสรุปได้ว่าสารทั้งสามชนิดส่งผลต่อการฟักออกจากไข่พยาธิหรือไม่ เนื่องจากเหนี่ยวนำการฟักด้วย trypsin ปรากฏว่าพยาธิทุกกลุ่มฟักตัวออกจากไข่ทุกกลุ่ม แม้ทดลองซ้ำหลายครั้ง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการทดลองในพยาธิหนอนตัวกลม *Haemoncus contortus* และ *Ascaris suum* ในระยะ first-stage larvae (L1) ใช้เวลาถึง 24 ชั่วโมง (Fetterer and Fleming, 1991) ซึ่งพบว่า PB ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.3 µg/ml สามารถยับยั้งการฟักออกจากเปลือกไข่ของพยาธิ *H. contortus* ได้และ PB ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ยับยั้งการเคลื่อนไหวอย่างสมบูรณ์ เมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารพิษที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิต 50% (ED₅₀) ของพยาธิ *H. contortus* ระยะ L1 เท่ากับ 1 µg/ml ในขณะที่จากการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้พบว่าค่า ED₅₀ ของไข่พยาธิ *O. viverrini* ที่ได้รับ PZQ เท่ากับ 8.1 µg/ml ส่วนกลุ่มที่ได้รับ cPI และ PB มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 9.6 และ 10.8 µg/ml เรียงตามลำดับ ค่า ED₅₀ ในการศึกษานี้มากกว่าการศึกษาของ Fetterer และ Fleming (1991) ซึ่งอาจเกิดจากหลายปัจจัยเช่น ชนิดพยาธิ ความหนาของเปลือกไข่และระยะเวลาที่นำมาทดสอบ เป็นต้น เปลือกไข่พยาธิ *O. viverrini* มีเปลือกหุ้ม 2 ชั้นและชั้นนอกมีความหนาประมาณ 3-8 µm (Pinlaor et al., 2008) การแพร่ของสารต้องอาศัยเวลาซึมผ่านเปลือกเข้าไป จากชั้นนอกเข้าสู่ชั้นในแล้วเข้าไปในตัวอ่อนของพยาธิ เมื่อเหนี่ยวนำการฟักออกจากไข่พยาธิ *O. viverrini* ด้วย trypsin เปลือกไข่จะแตกภายในครึ่งชั่วโมง นั้นเป็นข้อจำกัดในการศึกษาพยาธิชนิดนี้ ซึ่งผู้วิจัยได้ทดลองไม่ใช้ trypsin เหนี่ยวนำการฟัก ปรากฏว่าไข่พยาธิไม่สามารถฟักออกมาได้ตามเวลาปกติที่เคยปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ (ไม่ได้ระบุรายละเอียดลงในรายงานนี้) จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสารที่ทดสอบทั้งสามชนิดมีผลต่อการฟักออกจากไข่พยาธิหรือไม่ ผู้วิจัยเสนอว่าควรจะแช่ไข่พยาธิในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่นำมาทดสอบก่อน อย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อให้สารที่ทดสอบสามารถซึมผ่านเข้าไปด้านในเปลือกไข่ แล้วจึงเหนี่ยวนำให้ฟักออกจากไข่ ด้วย trypsin อาจจะทำให้ผลที่ดีกว่านี้การศึกษาในครั้งนี้

วงจรชีวิตของพยาธิ *O. viverrini* หลังจากพยาธิออกจากเปลือกไข่ จะเคลื่อนที่ไขผนังลำไส้ไปยังตับ ซึ่งสมมุติฐานของผู้วิจัยคือ สารชนิดใดชนิดหนึ่งในสามชนิดนั้นสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิ ในการไขผ่านผนังลำไส้ได้หรือไม่ หลังจาก host ได้รับสารนั้น โดยทำเลียนแบบการไขพยาธิในหลอดทดลอง ผู้วิจัยประยุกต์ใช้เยื่อเลือกผ่านแบบสังเคราะห์แทนผนังลำไส้ แล้วทดสอบสารและหาค่า % larval migration inhibition (% LMI) พบว่าการเคลื่อนที่ของพยาธิผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ของสารทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น

0.1, 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้มีการยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์สูงสุดเพียง 58% (ผลจาก PZQ) โดยมีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ PB หรือ cPI ที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน ค่า IC_{50} ของ PZQ, PB และ cPI เท่ากับ 1.43, 1.63 และ 8.8 $\mu\text{g/ml}$ เรียงตามลำดับ จากการศึกษาของ Lorsuwawnnarat และคณะ (2013) พบว่า PB สามารถยับยั้งพยาธิใบไม้ตับวัว *Fasciola gigantica* การไชผ่านแผ่นกรองได้ดีถึง 88-99% LMI ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ ค่า % LMI ของกลุ่มพยาธิที่ได้รับ PB ได้เพียง 15 และ 36% เรียงตามลำดับ อาจจะเป็นไปได้ว่า PB และ cPI อาจจะทำให้พยาธิระคายเคือง ทำให้พยาธิต้องเคลื่อนที่ออกจากบริเวณนั้น โดยไหลลงสู่ด้านล่างของแผ่นกรอง ซึ่งจากการสังเกตภายใต้กล้อง stereomicroscope พบว่าพยาธิที่ไชผ่านลงไปด้านล่างตะแกรงกรอง ไม่มีการเคลื่อนไหวและมีการเปลี่ยนแปลงที่ผิวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งสามารถตรวจสอบสมมุติฐานดังกล่าว ได้จากการศึกษาค่าความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหว (RM value) และดัชนีการรอดของพยาธิ (survival index) ในระยะ NEJs แม้ว่าค่าเฉลี่ยของ RM value ทั้ง PZQ และ PB มีผลต่อยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิได้ดีกว่า cPI แต่ค่า SI ของ cPI กลับใกล้เคียงกับ PZQ เมื่อเทียบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า cPI มีศักยภาพใกล้เคียงเทียบกับ PZQ และได้ผลดีกว่า PB ในระยะ NEJs ของพยาธิชนิดนี้ เมื่อนำพยาธิมาศึกษาต่อเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงที่ผิวพยาธิโดยกล้อง stereomicroscope และ SEM พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงคล้ายกันคือมีการบวม ตุ่มพอง การแตกของตุ่มพองและการหลุดลอกของผิวพยาธิ เรียงตามลำดับ แต่สิ่งที่แตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับ PZQ และกลุ่มที่ได้รับ PB และ cPI คือพยาธิในกลุ่มที่ได้รับ PZQ จะมีการยึดตัวและมีตุ่มพอง ไม่เคลื่อนไหว ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PB และ cPI มีลักษณะแบนคล้ายใบไม้มีตุ่มพองสีน้ำตาลติดตามตัว หลังจากศึกษาภายใต้กล้อง SEM ให้ผลเช่นเดียวกับที่เห็นด้วยกล้อง stereomicroscope แต่สามารถเห็นพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้ทั้งทางด้าน ventral และ dorsal ส่วนใหญ่พยาธิสภาพเกิดที่ด้าน ventral ส่วนหัวตั้งแต่ oral sucker ถึง ventral sucker เป็นส่วนใหญ่ ผลการศึกษาคล้ายเช่นเดียวกับใน *F. gigantica* (Lorsuwawnnarat et al., 2013)

ส่วนผลของสารทั้งสามชนิดในพยาธิ *O. viverrini* ระยะ 4 สัปดาห์ในหลอดทดลองพบว่าสารที่ส่งผลต่อ RM value และ SI มากที่สุดคือ PZQ รองลงมาคือ PB และ cPI เรียงตามลำดับ และเมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ PZQ ที่ยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิ *O. viverrini* ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 2.37 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ IC_{50} ของ PB เท่ากับ 2.90 $\mu\text{g/ml}$ และ IC_{50} ของ cPI เท่ากับ 5.02 $\mu\text{g/ml}$ จะเห็นว่าทั้ง PZQ และ PB ใช้ปริมาณใกล้เคียงกันในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิ *O. viverrini* ในขณะที่ cPI ต้องใช้ปริมาณสารเพิ่มเป็น 1.7 เท่าของ PZQ เนื่องจาก cPI เป็นสารสกัดหยาบซึ่งมีสารหลายตัวอยู่ในสารสกัดหยาบ หนึ่งในนั้นคือ PB ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้วัดปริมาณของ PB ใน cPI ว่ามีเท่าไร แต่จากศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า PB ในรากของ *P. zeylanica* มี PB เท่ากับ 1.2 % (Bothiraja et al., 2011) ดังนั้น cPI ต้องใช้เพิ่มอย่างน้อยเป็น 10-100 เท่าของ PB จึงจะได้ผลเทียบเคียงกับ PB ดังผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า cPI ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ส่งผลทั้งการเคลื่อนไหวและการรอดของพยาธิ (RM value & SI) ลดลง มีค่าใกล้เคียงกับ PB และ PZQ ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบผลของ IC_{50} ของ PB ในการศึกษาครั้งนี้ (2.90 $\mu\text{g/ml}$) กับการศึกษาของ Atjanasuppat และคณะ (2009) รายงานว่าผลของ PB ใน *C. elegans* และ *P. epicalitum* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.71 และ 130 $\mu\text{g/ml}$ เรียงตามลำดับ จะเห็นว่า PB มีผลต่อพยาธิ *O. viverrini* มากกว่า

C. elegans และ *P. epiclitum* (Atjanasuppat et al., 2009) และมีผลใกล้เคียงกับ *F. gigantica* ($IC_{50} = 2.4 \mu\text{g/ml}$) (Lorsuwannarat et al., 2014) นอกจากนี้เมื่อคำนวณหา IC_{50} ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ เท่ากับ $2.51 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งใกล้เคียงกับ PZQ และ PB เมื่อเปรียบเทียบผลของสารที่ทดสอบทั้งสามชนิดพบว่า PB และ cPI ส่งผลต่อค่า SI น้อยกว่า PZQ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่า SI ของ cPI ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ เทียบได้กับค่า SI ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ ของ PZQ นอกจากนี้ผลของ cPI ยังมีประสิทธิภาพดีกว่า ปวดทนต์หรือสารสกัดหยาบจากต้นมะหาด (*Artocarpus lakoocha*) ที่ทดสอบพยาธิ *F. gigantica* ในหลอดทดลอง ซึ่งใช้ปริมาณ 250 mg/ml จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่และเกิดพยาธิสภาพบริเวณผิวหนังพยาธิ (Saowakon et al., 2009) ซึ่งหากมีการศึกษาและพัฒนาต่อไป โดยดูสารต่างๆที่พบใน cPI ด้วยวิธี HPLC จะทำให้ทราบองค์ประกอบต่างๆ ที่พบใน cPI ซึ่งอาจจะมีสารบางชนิดเสริมฤทธิ์ นอกเหนือจาก PB

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังพยาธิหลังจากการศึกษาในหลอดทดลองแล้ว ด้วยกล้อง SEM พบว่าทุกกลุ่มที่ได้รับสารเกิดพยาธิสภาพตั้งแต่ 3 ชั่วโมงหลังการทดลอง ซึ่งในกลุ่มที่ได้รับสาร PZQ เกิดตุ่มพองและผิวหนังลอกบางแห่ง ตัวพยาธิยืดยาวออก ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PB และ cPI มีการเปลี่ยนแปลงของผิวในลักษณะเดียวกัน แต่ตัวพยาธิอ้วนกลมเหมือนใบไม้และในกลุ่ม cPI มีตุ่มพองขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่ได้รับ PB แต่พยาธิสภาพกินพื้นที่กว้างกว่าและพยาธิสภาพส่วนใหญ่อยู่ที่ส่วนหัวและกลางลำตัวด้าน ventral มากกว่าด้าน dorsal ซึ่งอาจจะเนื่องจากด้าน ventral เป็นส่วนที่พบ oral และ ventral suckers ซึ่ง oral sucker พยาธิใช้หาอาหาร ในขณะที่ ventral sucker ใช้เกาะกับผนังของโฮสต์ ทำให้สัมผัสกับสารเป็นส่วนใหญ่ เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Keiser et al., 2008; Lorsuwannarate et al., 2013, 2014; Saowakon et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเป็นไปได้ของ PB และ cPI สามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ในสัตว์ทดลองได้หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (negative control) และกลุ่ม vehicle พบว่าประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ (% protection) ของสารทดสอบทั้งสามชนิด PZQ และ PB ให้ผลดีกว่า cPI ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ PZQ ให้ผลดีที่สุดที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ ส่วน PB และ cPI ให้ผลรองลงมา โดยกลุ่มที่ได้รับ PB และ cPI ให้ผลใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษานี้แสดงผลเปรียบเทียบของ PZQ, PB และ cPI ในพยาธิ *O. viverrini* ทั้งในระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ พบว่า PZQ ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งสองระยะ ส่วน PB ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ในระยะ 4 สัปดาห์ดีกว่าระยะ NEJs ในขณะที่ cPI ออกฤทธิ์ต่อพยาธิในระยะ NEJs ดีกว่าระยะ 4 สัปดาห์ เมื่อพยาธิโตขึ้น ผิวพยาธิจะหนามากขึ้น ทำให้ป้องกันอันตรายได้ดีกว่าระยะ NEJs และความสามารถในการซึมผ่านของสารและครึ่งชีวิตของสารสกัด อาจจะเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้ cPI ออกฤทธิ์ได้ดีเฉพาะในระยะ NEJs ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองหา % protection ซึ่งผู้วิจัยให้สารที่ทดสอบตั้งแต่พยาธิยังอยู่ในระยะ NEJs กำลังไขผ่านผนังลำไส้ไปเจริญเป็นตับเต็มวัยที่ตับ ผลของ cPI ต่อ % protection จึงมีค่าใกล้เคียงกับ PB ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของสารสกัดหยาบจากต้นมะหาด (*Artocarpus lakoocha*) ต่อพยาธิใบไม้ตับตัว *F. gigantica* (Saowakon et al., 2009) ถึงแม้ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของ PB และ cPI ว่าจำเพาะเจาะจงกับส่วนใดของพยาธิ *O. viverrini* ซึ่งต้องการศึกษาต่อยอดในอนาคตว่า PB และ cPI ออกฤทธิ์ต่ออวัยวะเป้าหมายใดของพยาธิและสามารถพัฒนาสารสกัดจากสารสกัดหยาบแต่ละ fraction จากรากเจตมูลเพลิงแดงว่าให้ฤทธิ์เทียบเคียงกับ plumbagin ที่ขายในท้องตลาดหรือไม่ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นยาฆ่าพยาธิได้ในอนาคต โดยเป็น

การเพิ่มมูลค่าของพืชในประเทศไทยและส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาปลูกพืชชนิดนี้ เพื่อลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศและเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรและรักษาภูมิปัญญาของปราชญ์ชาวบ้าน นอกจากนี้อาจจะนำ cPI มาร่วมใช้กับ PZQ ซึ่งอาจจะเสริมฤทธิ์ในการกำจัดพยาธิได้ดีขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นการลดการดื้อยา PZQ หลังจากการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ซ้ำอีกครั้ง(Saengsawang et al., 2016)

ข้อเสนอแนะในการประยุกต์ใช้

1. สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดง มีฤทธิ์ต้านพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ดังนั้นควรนำสารสกัดมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาในด้านอื่น ๆ เช่น เภสัชศาสตร์ สมุนไพรป้องกันการติดเชื้อพยาธิและพิษวิทยา เป็นต้น
2. ในการพัฒนาสารสกัดเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ สามารถเพิ่ม ประสิทธิภาพได้โดยทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้นในอีกระดับหนึ่ง โดยประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านพยาธิยังคงอยู่
3. ทดสอบสารสกัดหยาบในสัตว์ทดลองที่เหนียวนำไปเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อเป็นข้อพื้นฐานในการพัฒนาศักยภาพของสารสกัดใช้ในการพัฒนาเป็นยาต่อไป

บรรณานุกรม

- Aunpromma S, Tangkowattana P, Papirom P, Kanjampa P, Tesana S, Sripa B, Tangkawattana S. High prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection in reservoir hosts in four districts of Khon Kaen Province, an opisthorchiasis endemic area of Thailand. *Parasitol Int* 2012; 61: 60-64.
- Bhamarapravati N, Thamavit W, Vajasthira S. Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. *Am J Med Hyg* 1978; 27: 787-794.
- Elkins DB, Haswell-Elkins MR, Mairiang E, Mairiang P, Sithithaworn P, Kaewkes S, Bhudhisawasdi V, Uttaravichien T. A high frequency of hepatobiliary disease and suspected cholangiocarcinoma associated with heavy *Opisthorchis viverrini* infection in a small community in north-east Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 715-719.
- Fetterer RH and Fleming MW. Effects of plumbagin on development of the parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum*. *Comp Biochem Physiol C*. 1991; 100: 539-542.
- Harinasuta T, Riganti M, Bunnag D. *Opisthorchis viverrini* infection: pathogenesis and clinical features. *Arzneimittelforschung* 1984; 34: 1167-1169.
- Hong, ST, Choi MH, Kim CH, Chung BS, Ji Z. The Kato-Katz method is reliable for diagnosis of *Clonorchis sinensis* infection. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.* 2003; 47: 345-347.
- Jongsuksuntigul P, Imsomboon T. Opisthorchiasis control in Thailand. *Acta Trop* 2003; 88: 229-232.
- Lorsuwannarat N, Saowakon N, Ramasoota P, Wanichanon C, Sobhon P. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.* 2013; 133:18-27
- Lorsuwannarat N, Piedrafita D, Chantree P, Sansri V, Songkoomkrong S, Bantuchai S, Sangpairot K, Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Chansela P, Sobhon P. The in vitro anthelmintic effects of plumbagin on newly excysted and 4-weeks-old juvenile parasites of *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol.* 2014; 136:5-13.
- Mathew N, Paily KP, Abidha, Vanamail P, Kalyanasundaram M, and Balaraman K. Macrofilaricidal activity of the plant *Plumbago indica/rosea* in vitro. *Drug Dev Res* 2002; 56: 33-39.
- Pinlaor S, Prakobwong S, Hiraku Y, Kaewsamut B, Dechakhamphu S, Boonmars T, Sithithaworn P, Pinlaor P, Ma N, Yongvanit P, Kawanishi S. Oxidative and nitrate

- stress in *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters: an indirect effect after praziquantel treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78(4):564-573.
- Pinlaor S, Sripa B, Sithithaworn P, Yongvanit P. Hepatobiliary changes, antibody response, and alteration of liver enzymes in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini*. *Exp Parasitol.* 2004; 108(1-2):32-39.
- Riganti M, Pungpak S, Sachakul V, Bunnag D, Harinasuta T. *Opisthorchis viverrini* eggs and adult flukes as nidus and composition of gallstones. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 1988; 19: 633-636.
- Ruangstittichai J, Viyanant V, Vichasri-Grams S, Sobhon P, Tesana S, Upatham ES, Hofmann A, Korge G, Grams R. *Opisthorchis viverrini*: identification of a glycine-tyrosine rich eggshell protein and its potential as a diagnostic tool for human opisthorchiasis. *Int. J. Parasitol.* 2006; 36: 1329–1339.
- Saengsawang P, Promthet S, Bradshaw P. Reinfection by *Opisthorchis Viverrini* after Treatment with Praziquantel. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(2):857-862.
- Saowakon N, Lorsuwannarat N, Changklungmoa N, Wanichanon C, Sobhon P. *Paramphistomum cervi*: the in vitro effect of plumbagin on motility, survival and tegument structure. *Exp Parasitol.* 2013;133:179-186
- Saowakon N, Tansatit T, Wanichanon C, Chanakul W, Reutrakul V, Sobhon P. *Fasciola gigantica*: anthelmintic effect of the aqueous extract of *Artocarpus lakoocha*. *Exp Parasitol.* 2009;122(4):289-298.
- Sayasone S, Odermatt P, Phoumindr N, Vongsaravane X, Sensombath V, Phetsouvanh R, Choulamany X, Strobel M. Epidemiology of *Opisthorchis viverrini* in a rural district of southern Lao PDR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 2007; 101: 40–47.
- Sithithaworn P, Andrews RH, De NV, Wongsaroj T, Sinuon M, Odermatt P, Nawa Y, Liang S, Brindley PJ, Sripa B. The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. *Parasitol Int* 2012; 61:10-16.
- Sithithaworn P, Haswell-Elkins M. Epidemiology of *Opisthorchis viverrini*. *Acta Trop* 2003; 88:187–94.
- Solomon FE, Sharada AC, Devi PU. Toxic effects of crude root extract of *Plumbago rosea* (*Rakta chitraka*) on mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 1993; 38: 79-84.
- Srinivasan L, Mathew N, and Muthuswamy K. In vitro antifilarial activity of glutathione S-transferase inhibitors. *Parasitol Res.* 2009; 105: 1179-182.

- Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, Mulvenna J, Laha T, Hotez PJ, Brindley PJ. Opisthorchiasis and *Opisthorchis*-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop* 2011; 120S: S158– S168.
- Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 349-356.
- Tansurat P. Opisthorchiasis. In: Marcial-Rojas, R.A. (Ed.), *Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases*, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 1971 ; pp. 536–545.
- Viyanant V, Brockelman WY, Lee P, Ardsungnoen S, Upatham ES. A comparison of a modified quick-Kato technique and the Stoll dilution method for field examination for *Opisthorchis viverrini* eggs. *J. Helminthol.* 1983; 57: 91–195.



ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นภวรรณ เสาวคนธ์ สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต (กายภาพบำบัด) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2540 ระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่นเมื่อปี พ.ศ. 2545 และระดับดุษฎีบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์) จากมหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2550 มีความเชี่ยวชาญทางด้านโครงสร้างชีวโมเลกุลและกายวิภาคศาสตร์ สถานที่ทำงานปัจจุบัน สาขากายวิภาคศาสตร์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในด้านงานวิชาการและการวิจัยของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นภวรรณ ทำงานเกี่ยวกับการศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับในสัตว์และในคน ส่วนหนึ่งจากการวิจัยครั้งนี้กำลังเขียนส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ และกำลังเขียนส่งในการประชุมระดับชาติในประเทศไทย

