



## รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ

*Fasciola gigantica*

Effect of crude extract of *Plumbago indica* Linn. Root on

*Fasciolar gigantica*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ

*Fasciola gigantica*

Effect of crude extract of *Plumbago indica* Linn. Root on

*Fasciolar gigantica*

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภวรรณ เสาวคนธ์

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2564

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรินทร์ ช่างกลิ้ง เหมาะและศาสตราจารย์.ดร.ประเสริฐ โสภณ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษา วิจัยอย่างดียิ่งตลอดมา รวมทั้งกรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์ และให้ยืมสารเคมีเบื้องต้น ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สันติ วัฒนฐานะ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยจำแนกพันธุ์พืช นอกจากนี้ ขอขอบคุณนายญาณวรุตม์ คำชื่น นักศึกษาปริญญาโท-เอก สาขาวิชาปรีคลินิกที่ช่วยเหลือทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องสัตว์ทดลองศูนย์เครื่องมือกลาง 9 และศูนย์สัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ ในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 1, 9 และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่เสียสละเวลา ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีมาตลอด ขอขอบคุณสัตว์ทดลองทุกชีวิตที่เสียสละทำให้เกิดการวิจัยในครั้งนี้ สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2560 ที่สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นภวรรณ เสาวคนธ์

พฤษภาคม 2564

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## บทคัดย่อภาษาไทย

การดื้อยาไตรคลาเบนดาโซล (Triclabendazole; TCZ) เกิดมากขึ้นอย่างแพร่หลายในปศุสัตว์ทั้งยุโรปและเอเชีย การค้นหายาฆ่าพยาธิตัวใหม่ จึงเป็นเรื่องเร่งด่วน ผลศึกษาในหลอดทดลองของพลับบาจิน (plumbagin; PB) จากรากเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* root) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิหนอนตัวกลมและพยาธิหนอนตัวแบนได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาผลการฆ่าพยาธิของ PB และสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง (crude extract of *P. indica* ; PI) ต้านต่อพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ระยะ newly excystment juveniles (NEJs) และระยะ 4 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับ TCZ ในพารามิเตอร์ต่างๆ โดยประเมินค่าร้อยละการยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อน (% LMI) ความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (RM) ดัชนีการรอดชีวิต (SI) ร้อยละการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ และการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นำพยาธิระยะ NEJs บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มี TCZ หรือ PB หรือ PI ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 µg/ml เรียงตามลำดับ หลังการทดลองพยาธิระยะ NEJs ถูกนำไปใส่ใน excystment tower และติดตามการเคลื่อนไหวของพยาธิที่สามารถไขผ่านแผ่นเมมเบรนได้ พยาธิระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ ถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม (n=10 ต่อกลุ่ม) ดังนี้ กลุ่มควบคุมเชิงลบ (กลุ่ม 1) กลุ่มควบคุมเชิงบวก (TCZ; กลุ่ม 2) กลุ่มที่ได้รับ PB (กลุ่ม 3-5) และกลุ่มที่ได้รับ PI (กลุ่ม 6-8) ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µg/ml เรียงตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในหลอดทดลองพยาธิถูกประเมินคะแนนค่า RM ที่ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12 และ 24 ภายใต้กล้อง stereomicroscope หลังจากนั้นพยาธิแต่ละช่วงเวลาที่ประเมิน ถูกนำไปผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาโดย SEM ผลการทดลองพบว่า PB มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิระยะ NEJs มากที่สุด (ร้อยละ 100) เมื่อเทียบกับ TCZ (% LMI = 79) และ PI (% LMI = 71) ประสิทธิภาพการฆ่าพยาธิระยะ NEJs ของ TCZ (RM= 0% และ SI = 0%) ให้ผลดีกว่า PB (RM= 22% และ SI = 34%) และ PI (RM= 67% และ SI = 67%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามประสิทธิภาพในการฆ่าพยาธิระยะ 4 สัปดาห์ของ PB และ PI (RM= 0% และ SI = 0%) มีประสิทธิภาพดีกว่า TCZ (RM= 98% และ SI = 100%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของพยาธิในระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ SEM พบว่าผิวของพยาธิทั้งในระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ เกิดการบวมและตุ่มพองที่ผิวพยาธิ ตุ่มพองจนแตก การกัดเซาะของผิวพยาธิและมีการหลุดลอกของผิวพยาธิหลังจากสัมผัสสารในชั่วโมงที่ 6 และ 12 ความรุนแรงของพยาธิสภาพในกลุ่มพยาธิที่ได้รับ PB มีความรุนแรงมากกว่ากลุ่มพยาธิที่ได้รับ TCZ และ PI ประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ของ TCZ ดีกว่า PB และ PI เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละการป้องกันการติดเชื้อพยาธิในสัตว์ทดลอง การค้นพบเหล่านี้เป็นข้อบ่งชี้ว่า PB มีศักยภาพต่อการฆ่าพยาธิ *F. gigantica* ในระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ PI มีฤทธิ์ต้านพยาธิ *F. gigantica* ระยะ 4 สัปดาห์เท่านั้น

## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

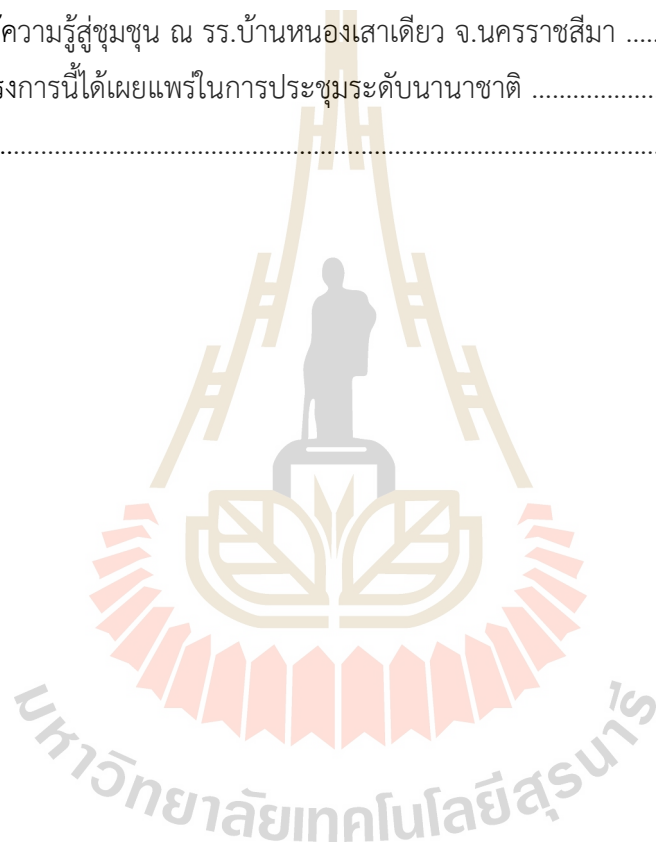
Triclabendazole (TCZ) drug resistance has been increasingly prevalent in livestock in Europe and Asia, driving the urgent need for a novel anthelmintic drug. *In vitro* studies of plumbagin (PB) from *Plumbago indica* root reported to inhibit the motility of nematodes and trematodes. Therefore, the objective of this study was to investigate the anthelmintic effect of PB and crude extract of *P. indica* (PI) root against newly excystment juveniles (NEJs) and 4-week-old of *Fasciola gigantica*. The effects of the extracts were compared with TCZ on various parameters, including % larval migration inhibition (% LMI), relative motility (RM), survival index (SI), % protection, and histopathological changes evaluated by Scanning Electron microscopy (SEM). NEJs were incubated with either control medium or medium containing TCZ, or PB, or PI at 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 µg /ml, respectively. Post-treatment, NEJs were plated into the excystment tower and the motility of flukes passing through the membrane was monitored. NEJs and 4-week-old flukes were divided into 8 groups (n=10 per group) as followed: negative control (group 1), positive control (TCZ; group 2), serial concentrations of PB (groups 3-5) and PI (groups 6-8) at 1, 10, and 100 µg /ml, respectively. After *in vitro* experiments, the RM values were evaluated after 1, 3, 6, 12, and 24 h incubation by scoring under the stereomicroscope. Samples collected from each incubation timepoint were processed, and histopathological changes were observed under SEM. Results suggested that PB was most efficient at inhibiting NEJs' migration (%LMI= 100) in comparison to TCZ (%LMI= 79) and PI (%LMI= 71). The parasitocidal action of TCZ (RM= 0% and SI =0%) was significantly more effective and rapid compared to PB (RM= 22% and SI =34%) and PI (RM= 67% and SI =67%). In contrast, PB and PI (RM= 0% and SI =0%) on 4-week-old of *F. gigantica* showed significantly greater parasitocidal effects than TCZ (RM= 98% and SI =100%). Morphological changes of NEJs and 4-week-old of *F. gigantica* recorded were progressed blebs, disruption of blebs, erosion, and desquamation of tegument of flukes after 6 and 12 h exposures. The severity of lesions in the PB-treated group was revealed to be worse than TCZ and PI-treated groups. TCZ prevented the *F. gigantica* infection better than PB and PI treatments when compare with percent of protection in vivo study. These findings indicated that PB had a potential anthelmintic effect on NEJs and 4-week-old of *F. gigantica* while PI affected only 4-week-old flukes.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
สารบัญ .....	ง-จ
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
ขอบเขตของการวิจัย .....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ.....	3
ยาฆ่าพยาธิ triclabendazole (TCZ) .....	4
สารสกัดพลัมบาจिनจากรากเจตมูลเพลิงแดง .....	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
วิธีการเก็บตัวอย่างและสกัดสารจากพืชตัวอย่าง .....	8
วิธีทดลองในหลอดทดลอง.....	9
วิธีทดลองในสัตว์ทดลอง.....	13
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล.....	13
บทที่ 4 ผลการวิจัย .....	16
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและบทสรุป	
สรุปผลการวิจัย .....	32
บทสรุปและข้อเสนอแนะ .....	36
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย .....	36
บรรณานุกรม .....	38

## สารบัญ

ภาคผนวก	หน้า
ตารางแสดงค่าร้อยละความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ในระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ .....	42
ตารางแสดงค่าร้อยละดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ในระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ .....	43
ภาพกิจกรรมให้ความรู้สู่ชุมชน ณ รร.บ้านหนองเสาเดียว จ.นครราชสีมา .....	44
งานวิจัยจากโครงการนี้ได้เผยแพร่ในการประชุมระดับนานาชาติ .....	45
ประวัติผู้วิจัย .....	46



## สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 3.1	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการไชของพยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i>	11
ตารางที่ 3.2	การศึกษาผลของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ <i>F.gigantica</i> ในระยะ NEJs และ ระยะ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง.....	12
ตารางที่ 3.3	แสดงการให้คะแนนการเคลื่อนไหวของพยาธิในระยะ NEJ และระยะ 4 สัปดาห์	12
ตารางที่ 3.4	เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ระหว่าง triclabendazole และ สารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	14





ช  
สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1	แสดงแสดงวงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ <i>Fasciola gigantica</i> ..... 4
รูปที่ 2.2	แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ triclabendazole และเมแทบอลิไตในรูปแบบต่างๆ 5
รูปที่ 2.3	แสดงโครงสร้าง plumbagin ..... 6
รูปที่ 3.1	ลักษณะของใบ ลำต้น รากและดอกของ <i>Plumbago indica</i> ( <i>P. rosea</i> ) ส่วนของใบและลำต้น (1), ราก (2) และดอก (3) ..... 8
รูปที่ 4.1	ร้อยละของการยับยั้งการไชของพยาธิผ่านเยื่อเลือกผ่านสังเคราะห์ ของพยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ..... 17
รูปที่ 4.2	ร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดชีวิตของ พยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ระยะ newly excysted juveniles (NEJs) หลังที่ได้รับสารชนิดต่างๆ ..... 19
รูปที่ 4.3	ร้อยละของการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดชีวิตของ พยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ระยะ 4 สัปดาห์ หลังที่ได้รับสารชนิดต่างๆ ..... 21
รูปที่ 4.4	ความสัมพันธ์ช่วงอายุของพยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> พยาธิที่ได้รับสารต่างๆ มีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเทียบกับการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิ.. 23
รูปที่ 4.5	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่ทดสอบมีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในพยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ ..... 24
รูปที่ 4.6	ร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ที่ได้รับสารชนิดต่างๆมีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 26
รูปที่ 4.7	ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของ พยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ระยะ NEJs หลังจากได้รับสารต่าง ๆ..... 28
รูปที่ 4.8	ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของ พยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ระยะ NEJs หลังจากได้รับสาร PB ที่ชั่วโมงที่ 12 ..... 29
รูปที่ 4.9	ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ระยะ 4 สัปดาห์ หลังจากได้รับสารต่าง ๆ..... 30
รูปที่ 4.10	ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พยาธิใบไม้ตับ <i>F. gigantica</i> ระยะ 4 สัปดาห์ หลังจากได้รับสารต่าง ๆ..... 31

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรค Fasciolosis หรือ fascioliasis เป็นการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในกลุ่ม *Fasciola* spp. (*Fasciola hepatica* และ *Fasciola gigantica*) ซึ่งการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ สามารถพบทั้งในคนและในสัตว์เท้ากีบ เช่น วัว ควาย แพะ และ แกะ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ในสัตว์ป่า เช่น กระต่าย กวาง ม้า และ อูฐ เป็นต้น องค์การอนามัยโลกหรือ World Health Organization (WHO) ประกาศว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ จัดเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขในประเทศที่กำลังพัฒนาและพัฒนา (World Health Organization :WHO, 2006). ซึ่งมีรายงานทางระบาดวิทยาว่าพบการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในหลายๆประเทศในเขตร้อนในทวีปเอเชียและแอฟริกา เช่น อิหร่าน ตุรกี ปากีสถาน แอฟริกาใต้ บราซิล และรวมถึงอินเดีย สาธารณรัฐประชาชนลาว เวียดนาม และประเทศไทย เป็นต้น (Mas-Coma et al., 2019) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจาก *F. gigantica* ในประเทศแถบเขตร้อนชื้น สามารถพบได้ทั้งในสัตว์เท้ากีบและในมนุษย์ มีอัตราเสี่ยงมากกว่า 180 ล้านคน ซึ่งทำให้มูลค่าการสูญเสียรายได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ทั้งคุณภาพเนื้อสัตว์ นม ขนสัตว์ และสินค้าแปรรูปจากสัตว์เศรษฐกิจ โดยเฉพาะ วัว แพะ และ ฯลฯ มากถึงปีละ 3 ล้านๆ ดอลลาร์ (Mungube et al., 2006; WHO, 2006) ความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในโคและกระบือในประเทศไทย มีความชุกภายในช่วงระหว่างร้อยละ 0-85 โดยภาคเหนือมีอัตราการติดเชื้อพยาธิสูงสุด รองลงมาคือภาคอีสาน ภาคตะวันตก และภาคใต้มีอัตราการติดเชื้อต่ำที่สุด (บอย บัญเอื้อ และคณะ, 2556) การติดเชื้อพยาธิผ่านทางอาหารเป็นสำคัญ เช่น กินพืชน้ำหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนพยาธิระยะติดต่อ (metacercaria) ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนตามมา เช่น ตับแข็ง และมะเร็ง เป็นต้น (Mas-Coma et al., 2019)

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อปรสิตมีหลายวิธี ทั้งตรวจทางรังสีวินิจฉัย ตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระ ซึ่งมีข้อจำกัดคือเป็นวิธีที่มีความแม่นยำ (sensitivity) ต่ำ ในขณะที่การตรวจโดยใช้ซีรัม (serology test) เป็นการติดตามโปรตีนที่แสดงออกของพยาธิในแต่ละระยะของพยาธิ มีความจำเพาะสูง ความแม่นยำสูง และสามารถพัฒนาโปรตีนหลายๆชนิดที่มีศักยภาพเป็น marker เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจโรคหรือพัฒนาเป็นวัคซีนในอนาคต ซึ่งยังคงมีการศึกษาวิจัยในปัจจุบัน ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ แพทย์ยังคงใช้ยา triclabendazole (TCZ) ซึ่งเป็นยาที่แนะนำให้ใช้รักษาการติดเชื้อพยาธิในปัจจุบัน เพราะสามารถฆ่าพยาธิได้ทั้งระยะตัวไม่เต็มวัย และตัวเต็มวัย สามารถใช้ได้ทั้งในคนและในสัตว์ ผลข้างเคียงน้อย แต่มีข้อด้อยเพราะเป็นยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาค่อนข้างสูง (Mas-Coma et al., 2019) แต่มีรายงานว่าสัตว์ที่ได้รับการรักษาด้วยยา TCZ พบการอุบัติการณ์ติดเชื้อพยาธิซ้ำ ค่อนข้างสูง การตอบสนองต่อยาน้อยลงหรือมีการดื้อยาเมื่อใช้ยา TCZ ซ้ำๆ (Duthaler et al., 2010; Moll et al., 2000; Overend and Bowen, 1995) จึงทำให้มีการพัฒนาวัคซีนป้องกันการติดเชื้อในสัตว์เท้ากีบเศรษฐกิจขึ้นหลายชนิด (Kueakhai et al., 2011, 2015; Sansri et al., 2015; Sethadavit et al., 2009) แต่ผลของวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ ยังไม่ที่น่าพอใจ ดังนั้นจึงมีการริเริ่มทำการพัฒนาเป็นวัคซีนร่วม (recombination vaccines) ในปัจจุบัน แม้ว่าการตัดวงจรชีวิตของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเป็นการลดอัตราเสี่ยงการติดเชื้อ

โดยการกำจัดโฮสต์กึ่งกลาง แต่ใช้พยาธิ *F. gigantica* สามารถเกาะในฝักถอยน้ำ เช่นฝักบุง ฝักกระเฉด หรือแม้กระทั่งต้นข้าว ดังนั้นการค้นคว้าหาชนิดใหม่เพื่อใช้ในการป้องกันและรักษา จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ในการแก้ปัญหาการติดเชื้อนี้ เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการรายงานผลของสารสกัดบริสุทธิ์พลัมบาจิน (plumbagin :PB) ที่สกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดง สามารถยับยั้งการเคลื่อนไหว อัตราการรอดของพยาธิเลือด *Schistosoma mansoni* (Lorsuwanarat et al., 2013) พยาธิในกระเพาะ *Paramphistomum cervi* (Saowakon et al., 2013) และพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในระยะ 4 สัปดาห์ในหลอดทดลองเท่านั้น (Lorsuwanarat et al., 2014) ซึ่งยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดหยาบมีศักยภาพต่อการเคลื่อนไหวของและกำจัดพยาธิได้หรือไม่ เพื่อเป็นการศึกษาต่อยอดองค์ความรู้เดิม ดังนั้นวัตถุประสงค์การศึกษาครั้ง เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระหว่าง triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง
- 1.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิ ที่เกิดจากผลของยาฆ่าพยาธิ triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

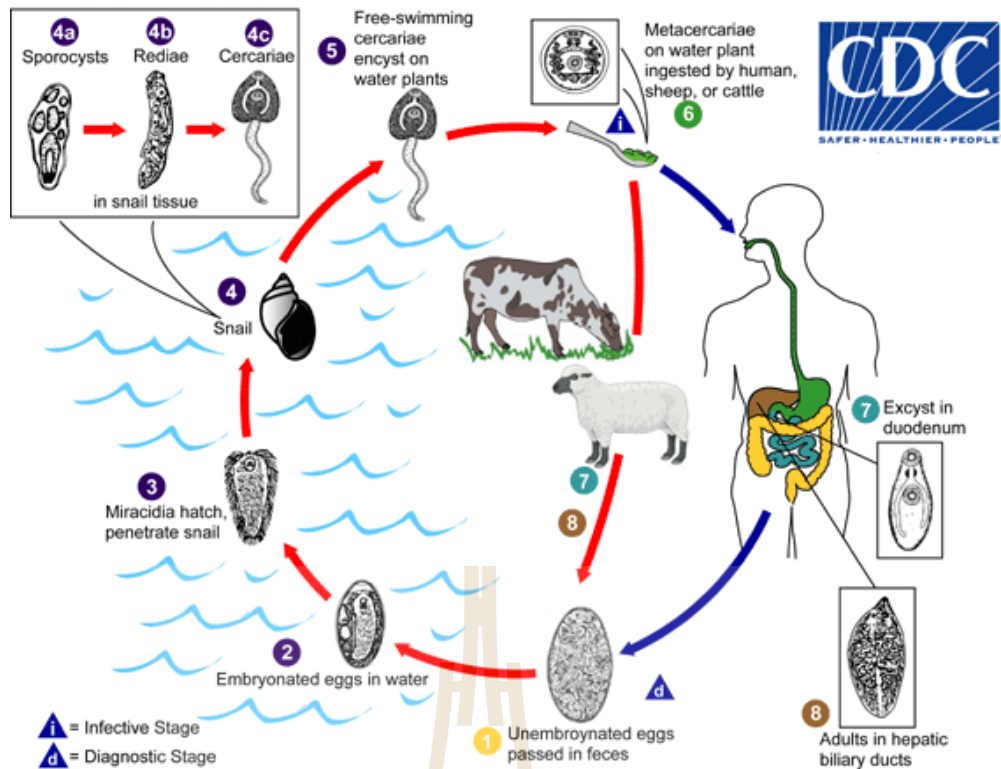
### ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ จะทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงและยา TCZ ต่อพยาธิใบไม้ตับในหลอดทดลอง ด้วยการวัดปริมาณการฟักตัวออกจากเปลือกไข่ (excystment) และการเคลื่อนที่ผ่านตะแกรงแผ่นกรองสังเคราะห์ (laval migration inhibition) โดยใช้พยาธิระยะ metacercaria เหนียวนำไปให้ไซออกจากเปลือกไข่และให้ไซผ่านตะแกรงสังเคราะห์ (excystment tower) วัดจำนวนการไชของพยาธิออกจากเปลือกและร้อยละการยับยั้งการเคลื่อนย้ายของพยาธิ และดูการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิหลังแช่ในสารทดสอบแต่ละชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงและยา TCZ ต่อพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง โดยการเหนียวนำไปติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* หลังจากนั้นจะป้อนสารสกัดหรือยาฆ่าพยาธิ เพื่อทำการวัด percent protection จากการเก็บพยาธิจากตับและทางเดินท่อน้ำดี วัดขนาดและจำนวนพยาธิที่พบเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม โดยใช้ค่าสถิติ one-way ANOVA ที่ความน่าเชื่อถือ 95% ด้วยโปรแกรม SPSS software

## บทที่ 2

### วรรคกรรมทบทวน

วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* (รูปที่ 2.1) พยาธิตัวเต็มวัยวางไข่ที่มีตัวอ่อนออกมาตามทางเดินท่อน้ำดีเข้าสู่ทางเดินอาหารปนกับอุจจาระของโฮสต์ตกลงไปในแหล่งน้ำ แล้วไข่ฟักเป็นตัวอ่อนระยะ miracidium ในแหล่งน้ำว่ายไชเข้าสู่หอยฝาเดียวในตระกูล Lymnaea ซึ่งเป็นตัวกลางตัวที่หนึ่งของพยาธิ *F. gigantica* พยาธิจะพัฒนาอยู่ในหอยชนิดนี้ และเจริญเป็นพยาธิระยะ sporocyst ในระบบทางเดินอาหารของหอย แล้วเจริญเป็นตัวอ่อนระยะ rediae ในที่สุด rediae จะอาศัยอยู่ในอวัยวะต่างๆ ของหอย เมื่อเจริญอยู่ในหอยเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว ตัวอ่อนระยะ rediae จะเจริญเป็นระยะ cercaria ซึ่ง cercaria หลังจากนั้นหอยจะขับพยาธิออกมาจากตัวหอยในระยะนี้เรียกว่า metacercaria ตัว metacercaria จะหุ้มด้วยเปลือกหุ้มสองชั้น (encyst) ลอยไปติดพืชที่อยู่ในน้ำ โฮสต์ตัวกลางตัวที่ 2 ได้แก่ สัตว์เท้ากบหรือคนที่กินพืชผักที่ปนเปื้อนไข่พยาธิที่อยู่ในน้ำ เช่น ผักบุ้ง ผักกระเฉด ผักลอยน้ำ หรือแม้แต่ต้นข้าวในนา เมื่อสัตว์หรือคนกินพืชที่ปนเปื้อนเข้าไป metacercaria จะถูกน้ำย่อยจากกระเพาะและน้ำไส้เล็กส่วนต้น กระตุ้นให้ออกจากเปลือกหุ้ม (cyst) เป็นพยาธิในระยะ newly excysted juveniles (NEJs) โดยพยาธิระยะนี้จะไชผนังลำไส้ไปที่เนื้อตับ แล้วเข้าไปอาศัยในเนื้อตับหรือท่อน้ำดีเพื่อพัฒนากลายเป็นระยะตัวโตเต็มวัย โดยกินเลือดเป็นอาหาร พยาธิใบไม้ตับชนิดที่สามารถติดต่อได้ในคน เมื่อนำน้ำดีที่มีไข่พยาธิมาปรุงอาหารโดยไม่ผ่านความร้อนหรือผ่านความร้อนเพียงเล็กน้อย พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จะไชเนื้อตับ ทำให้เกิดพยาธิสภาพภายในตับเกิดเป็นพังผืดและท่อน้ำดีตีบแคบ แข็ง ทำให้การย่อยของโฮสต์เสียไป นอกจากนี้ยังเสียเลือดจากการไชของพยาธิ คุณภาพของเนื้อ นม ขนสัตว์ รวมทั้งสุขภาพสัตว์จะแย่งลงเรื่อยๆ เมื่อจำนวนพยาธิเพิ่มขึ้น พยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* สามารถอยู่ในร่างกายมนุษย์ได้นานหลายกว่าจะแสดงอาการต่างๆ ซึ่งการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้สามารถทำให้เกิดการอักเสบของท่อน้ำดี ในประเทศไทย พื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ส่วนใหญ่เป็นประชาชนที่อยู่ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากการปรุงอาหารของภูมิภาคดังกล่าวส่วนใหญ่ไม่ผ่านความร้อนจนอาหารสุก



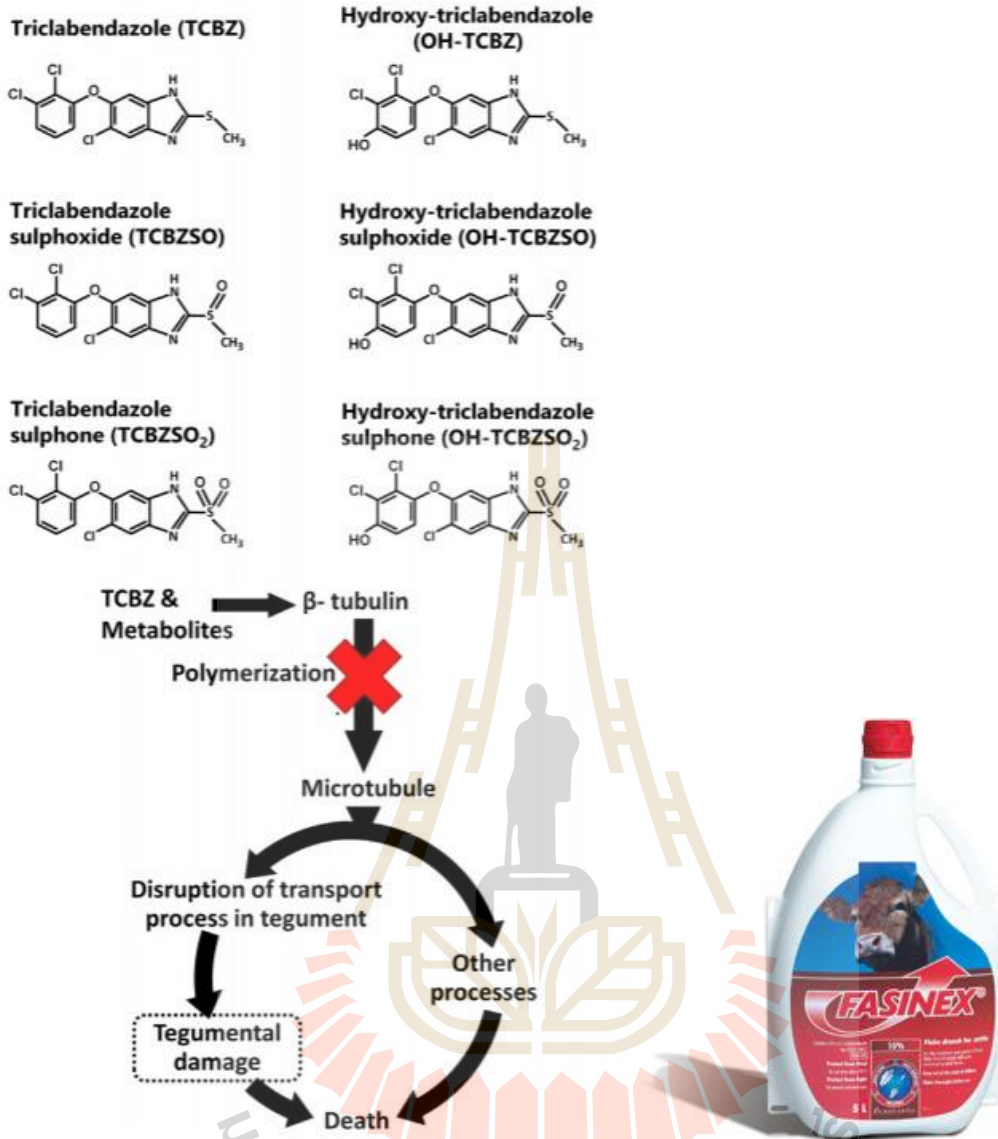
รูปที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* โดยไข่จะปนเป็นในน้ำ แล้วฟักออกจากไข่ พัฒนาเป็น miracidia อาศัยอยู่ในหอยจนกระทั่งเป็น cercaria จะออกจากหอย ว่ายน้ำไปเกาะผักลอยน้ำและฝังตัวอยู่ในรูป cyst (metacercaria) (ที่มา <http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>)

### ยาฆ่าพยาธิ triclabendazole (TCZ)

Triclabendazole (รูปที่ 2.2) เป็นยาในกลุ่ม benzimidazoles มีใช้มานานแล้ว ในการออกฤทธิ์ของยานี้คาดว่าเมื่อยาและเมแทบอลิต์ (ในรูป sulfoxide และ sulfone) ถูกดูดซึมผ่านผิวพยาธิ (tegument) จะรบกวนการทำหน้าที่ของ  $\beta$ -tubulin ทำให้ยับยั้งการจับตัวของ microtubule ที่ basement membrane ของผิวพยาธิ ส่งผลให้เกิดการพยาธิสภาพโครงสร้างชั้นลึกลับกับผิวพยาธิ การสร้างโปรตีนและการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญของพยาธิ สามารถกำจัดหนอนพยาธิได้ทั้งตัวอ่อนและตัวโตเต็มวัย (หรือตัวแก่) เป็นยาชนิดเดียวที่องค์การอนามัยโลก (WHO) แนะนำให้ใช้รักษาโรคพยาธิใบไม้ในตับชนิด fascioliasis ยานี้อยู่ใน “World Health Organization’s List of Essential Medicines” (Webb and Cabada, 2018) จัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยมากที่สุดในขณะนี้ ขนาดยาที่ WHO แนะนำไว้ คือ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รับประทานครั้งเดียว หากเป็นมากให้รับประทาน 2 ครั้ง ห่างกัน 12-24 ชั่วโมง ห้ามใช้ติดต่อกันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถรับยานี้ได้จาก WHO อย่างไรก็ตามมีบริษัทยาผลิตยานี้ ออกวางจำหน่ายทั่วไป ใช้เป็นยากำจัดหนอนพยาธิได้ทั้งในคนและสัตว์ ข้อจำกัดของยาชนิดนี้คือห้ามใช้ในสัตว์ที่อยู่ในระยะให้นมลูกเป็นอันตราย (ใช้ชื่อการค้าต่างกัน เช่น Fasinx<sup>®</sup>) เมื่อเร็วๆ นี้ triclabendazole ได้รับอนุมัติให้วางจำหน่ายในประเทศสหรัฐอเมริกา ในข้อบ่งใช้สำหรับการรักษาโรคพยาธิใบไม้ในตับชนิด fascioliasis ในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป ผลิตในรูปยาเม็ดความแรง 250 มิลลิกรัม แบ่งครั้งได้ ขนาดที่แนะนำไว้ คือ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รับประทาน 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง โดยรับประทานยาพร้อมอาหาร



อาการไม่พึงประสงค์ที่อาจพบเช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ท้องเดิน เหงื่อออกมาก ปวดศีรษะ คัน เกิดลมพิษ ปวดกล้ามเนื้อ

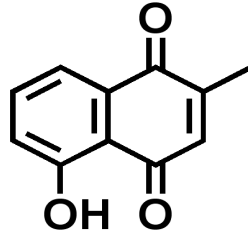


รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Triclabendazole และเมแทบอลิไตในรูปแบบต่างๆ และผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่วางขายในท้องตลาด (ที่มา Shareef et al., 2014) และ en.wikipedia.org)

**สารสกัดปลัมบาจिनจากรากเจตมูลเพลิงแดง (Plumbagin of *Plumbago rosea* root)**

ต้นเจตมูลเพลิงแดงมีถิ่นกำเนิดในอินเดียและเขตร้อนทั่วไป เป็นไม้พุ่มสูง 0.8-1.5 เมตร ยอดอ่อนสีแดง ลำต้นกลมเรียบ มีสีแดงบริเวณข้อ เป็นพืชใบเดี่ยว ใบเรียวยาวเรียงสลับรูปไข่แกมวงรีกว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง มีลักษณะกลีบดอกสีแดง ผลเป็นผลแห้งแตกได้ รากมีสรรพคุณบำรุงโลหิต ช่วยย่อยอาหารเจริญอาหาร แก้ปวดท้องแน่นจุกเสียด ขับลมในลำไส้ แก้ท้องร่วง แก้ริดสีดวงทวาร แก้บวม แก้ปวดบวม ฆ่าพยาธิ ระวังอาการปวดฟัน แก้ไข้ รักษาฝี แก้ปวดบวม แก้โรคข้อและเป็นอัมพาต ขับเหงื่อ แก้หนังต่างและโรคผิวหนัง แก้รังแค แก้ปวดศีรษะ ขับฟอกโลหิตระดู ทำให้แห้งลูกต้นมีสรรพคุณขับโลหิตระดู แก้ปวดท้อง กระพี้มีสรรพคุณแก้เกลื้อนข้าง แก่นมีสรรพคุณแก้ไข้เรื้อนกวาง ขี้เรื้อนน้ำเต้า ดอกมีสรรพคุณแก้โรคตาและโรคที่ทำให้หนาวและเย็น ลูกมีสรรพคุณแก้โรคพยาธิผิวหนัง แก้ฝี

การใช้พืชชนิดนี้ต้องระมัดระวัง เพราะทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังเป็นตุ่มพองได้ รายงานวิจัยพบว่า ทั้งต้นมีสาร plumbagin, sitosterol, stigmasterol, campesterol และ 6-hydroxyplumbagin สาร plumbagin (รูปที่ 2.3) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในลำไส้ (ที่มา: [www.herbal.pharmacy.psu.ac.th/data/herbal/Plumbago\\_rosea.html](http://www.herbal.pharmacy.psu.ac.th/data/herbal/Plumbago_rosea.html))



รูปที่ 2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของ plumbagin ( $C_{11}H_8O_3$ ) (ที่มา <https://www.sigmaaldrich.com>)

### คุณสมบัติทางเคมีและการออกฤทธิ์ของพลัมบาจिन (plumbagin)

plumbagin (PB) มีสูตรโครงสร้างเป็น 2-Methyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (รูปที่ 2.3) ซึ่งเป็นผงสีเหลืองส้ม มีคุณสมบัติละลายน้ำ (<http://sis.nlm.nih.gov/>) Plumbagin มีฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิตัวกลม *Setaria digitata* (Mathew et al., 2002; Srinivasan et al., 2009) และมีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนในระยะติดเชื้อของพยาธิตัวกลม *H. contortus* และ *A. suum* (Fetterer and Fleming, 1991) มีผลยับยั้งการเคลื่อนไหวและลดอัตราการรอดของพยาธิเลือด *Schistosoma mansoni* (Lorsuwanarat et al., 2013) พยาธิในกระเพาะ *Paramphistomum cervi* (Saowakon et al., 2013) และพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในระยะ 4 สัปดาห์ (Lorsuwanarat et al., 2014) นอกจากนี้มีรายงานว่า plumbagin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* จากยุงบ้าน *Aedes aegypti* และ *Biomphalaris glabrata* ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิ *S. mansoni* ในหลอดทดลองได้ (Padhye et al., 2010; Riberiro et al., 2009) โดยมีบทบาทหลักในการทำให้เกิด superoxide ภายในเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อผนัง tegumental surface และทำให้ antigen ของพยาธิถูกเปิดเผยต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย การศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดจากรากยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคกลากเกลื้อน และยีสต์ได้หลายชนิด ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารแอฟลาทอกซินบี1 นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ ต้านการก่อกลายพันธุ์ ป้องกันการเกิดมะเร็งจากสารก่อมะเร็ง (Paiva et al., 2003 ;Padhye et al., 2010) จากการศึกษาทดสอบพิษวิทยาของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงในหนูเม้าส์และหนูแรพพบว่าค่า  $LD_{50}$  ในหนูถีบจักรผ่านทางช่องท้องเท่ากับ 239.88 mg และผ่านทางปากเท่ากับ 1148.15 mg/kg BW ตามลำดับ (Solomon et al., 1993) และมีน้ำหนักของตับ ม้ามและอวัยวะลดลงในเพศผู้ ส่วนในเพศเมียน้ำหนักของมดลูกและต่อมไทมัสลดลง เนื่องจากสาร plumbagin มีผลต่ออินด้านการเจริญพันธุ์ของสัตว์ทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมีย ทำให้แท้งลูกได้ จึงเป็นข้อควรระวังห้ามใช้สารพลัมบาจिनในสตรีตั้งครรภ์ระหว่างการตั้งครรภ์ เพราะทำให้มดลูกบีบตัวอาจทำให้แท้งได้ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง

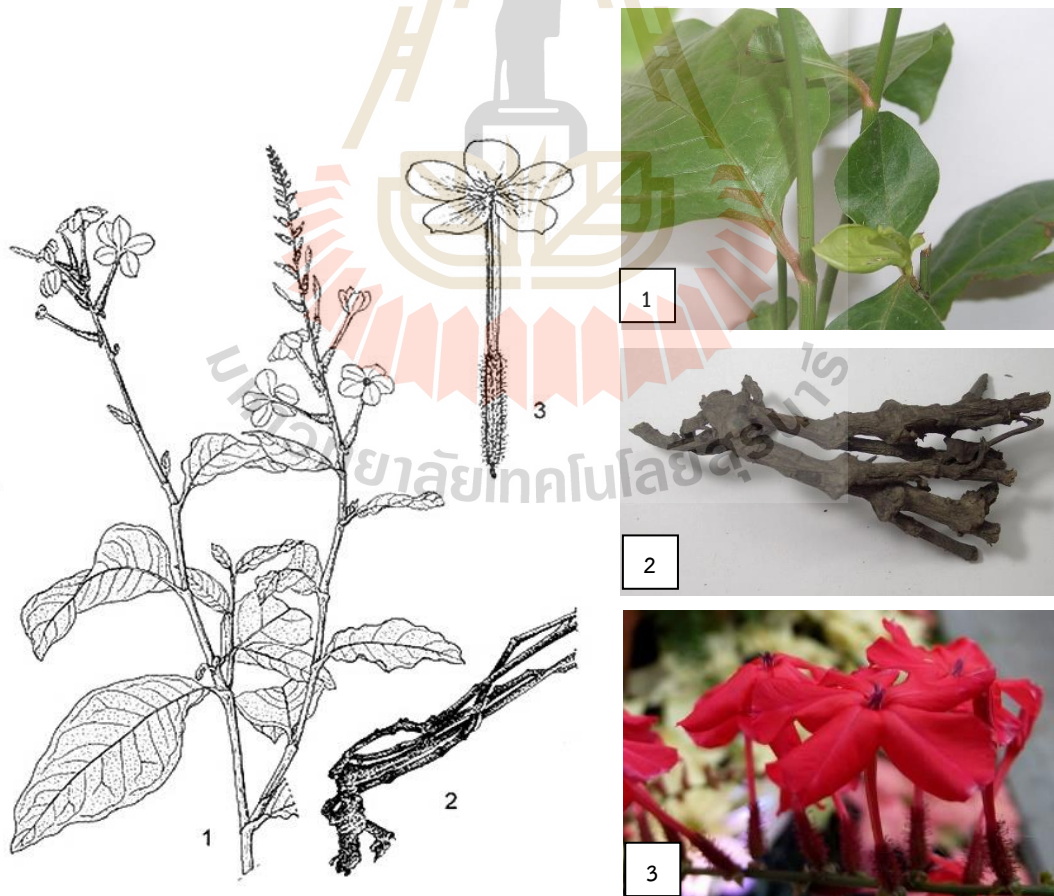
## บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

## วิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

## 3.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการสกัดสารจากพืชตัวอย่าง

สารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดง ได้จัดซื้อจากบริษัท SM. Chemical จำกัด ส่วนสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง ทำโดยนำรากเจตมูลเพลิงแดง ชื่อมาจากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำปาง (อายุประมาณ 24-30 เดือน) นำมาพิสูจน์รูปพรรณสัณฐานทางชีววิทยา โดยผศ. ดร. สันติ วัฒนฐานะ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยอ้างอิงจากลักษณะดอก ใบ ลำต้นและราก (รูปที่ 2.1) หลังจากล้างเศษดินและสิ่งที่เป็นเปื้อนออกจนสะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นในครั้งสุดท้ายแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่ห้องปฏิบัติการพืช สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (หมายเลขตัวอย่าง: N.Saowakon 01) นำรากที่ผ่านการทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว นำไปอบผ่านลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C หลังจากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร ผสมสมุนไพรที่ได้ถูกเก็บในถุงที่ปิดสนิท ในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปสกัดต่อในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.1 ลักษณะของใบ ลำต้น รากและดอกของ *Plumbago indica* (*P. rosea*) ส่วนของใบและลำต้น (1), ราก (2) และดอก (3)



### การเตรียมสารสกัดจากพืช

เนื่องจากไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการใช้สารสกัดหยาบจากรากต้นเจตมูลเพลิงแดงมาก่อน จึงเริ่มต้นสกัดอย่างง่าย โดยนำผงสมุนไพรของรากเจตมูลเพลิงแดงที่ตากแห้ง ไปสกัดในน้ำกลั่น หรือใน 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 แล้วแยกน้ำกลั่นหรือ 95% ethanol ออก เมื่อของเหลวลดลงเหลือประมาณ 1/5 จึงนำสารสกัดที่ได้ ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทดลองและหาเปอร์เซ็นต์ yield ที่ได้จากสารสกัดว่ามีปริมาณเท่าไรคิดเป็นกิโลกรัมเปอร์เซ็นต์ตั้งสูตรคำนวณต่อไปนี้

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

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

### 3.2 ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระหว่าง triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงในหลอดทดลอง

#### 3.2.1 การเตรียม วัสดุ อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

##### 3.2.1.1 เตรียมไข่พยาธิและโฮสต์กึ่งกลาง

เก็บไข่พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยเก็บจากถุงน้ำดีของวัวที่พบพยาธิในระยะตัวเต็มวัย ณ โรงฆ่าสัตว์จังหวัดปทุมธานี สระบุรีและนครราชสีมา นำมา incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 7 วันทำการฝักตัวอ่อนระยะ miracidia หลังจากนั้นนำพยาธิใส่น้ำให้ไข่เข้าสู่หอยน้ำจืด *Lymnaea ollula* แล้วเลี้ยงหอยต่อจนกระทั่งหอยปล่อยพยาธิตัวอ่อนในระยะ metacercariae ออกมาติดกระดาษพลาสติก นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำไปทดลอง

##### 3.2.1.2 เตรียมตัวอย่างพยาธิในระยะ newly excysted juveniles (NEJs) และพยาธิอายุ 4 สัปดาห์

นำพยาธิตัวอ่อนระยะ metacercariae จากกระดาษพลาสติกโดยใช้ฟู่กันเขี่ย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นนำพยาธิไปผ่านกระแกรงกรอง เพื่อแยกเปลือกของไข่พยาธิและตัวพยาธิออกจากกัน โดยใช้วิธีของ Wilson และคณะ (1998) โดยพยาธิที่ถูกแยกจากตะแกรงกรองจะอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-199 พยาธิระยะนี้เป็นระยะ NEJs เพื่อใช้การทดลองต่อไป ส่วนพยาธิระยะ 4 สัปดาห์นั้นต้องใช้สัตว์ทดลองโดยเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อพยาธิ โดยการป้อนไข่พยาธิ 30 ฟอง/หนู 1 ตัว ป้อนในหนูแฮมสเตอร์ Golden Syrian เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนัก 60-80 กรัม จำนวน 30 ตัว/ครั้ง ทำ 2 ซ้ำ (พยาธิจะออกมาประมาณ 15 ตัว จากที่ป้อนไข่ 30 ฟอง) เลี้ยงหนูครบสี่สัปดาห์ โดยโครงการวิจัยได้รับการรับรองการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองตามเลขที่ 5/2560 นำหนูทั้งหมดมาฆ่าด้วยวิธีเมตาฆาต โดยจับสัตว์ทดลองตามหลักการควบคุมสัตว์ทดลอง แล้วฉีด pentobarbital เกินขนาด 2-3 เท่าของขนาด สังเกตสัตว์ไม่สามารถเคลื่อนไหว ทำการ

ตรวจสอบการรับรู้รส จากการจิกเล็บ ไม่มีการตอบสนอง แสดงว่าสัตว์หลักลิ้ม เก็บดับ แล้วเก็บพยาธิ จากเนื้อตับ นำมาล้างด้วย 0.85% NaCl เลือกเฉพาะพยาธิที่มีการเคลื่อนที่ทุกส่วนมาทดลองต่อไป

### 3.2.1.3 การเตรียมสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงและยา TCZ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-199

การสกัดสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงจัดซื้อจากร้านขายยาแผนโบราณ ในจังหวัด เชียงใหม่และลำพูน โดยนำรากเจตมูลเพลิงแดงที่ตากแห้งมาบดเป็นผง แช่ใน 95% เอทานอล 48 ชั่วโมง พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm หลังจากนั้นกรองตะกอนด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายผ่าน เครื่อง Evaporator โดยค่อยๆลดความดันแยกเอทานอลออก นำสารสกัดที่ได้นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทดลอง ส่วนยา TCZ ที่ใช้ในการทดลอง มีชื่อทางการค้า (Fasinex® 10% Novartis) ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ นอกจากนี้ยังใช้สารสกัดพลมบาจินบริสุทธิ์จากรากเจตมูลเพลิงแดง ได้จัดซื้อจากบริษัท S.M Chemical จำกัดหรือบริษัท Sigma เป็นคู่เทียบ ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมียาปฏิชีวนะ (penicillin 50 IU และ gentamycin 30 IU/ml) โดยผสมเข้ากับสารทุกชนิดที่นำมาทดลองโดยความเข้มข้นที่ใช้ในการ ทดลองเพื่อใช้ทดสอบการเคลื่อนไหวของพยาธิและอัตราการรอดของพยาธิใบไม้ตับ ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µg/ml และทดลองการความสามารถในการไชผ่านออกเปลือกไข่ของพยาธิ (migration inhibition test) ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 µg/ml

### 3.2.2 การทดสอบผลของสารสกัดหยาบต่อพยาธิในหลอดทดลอง (*In vitro study*)

#### 3.2.2.1 การศึกษาการยับยั้งการไชของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs ผ่านแผ่น กรองสังเคราะห์ (Excystment tower)

ในวงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* หลังจากพยาธิฟักตัวออกจากเปลือกไข่แล้ว จะไชผ่าน เนื้อเยื่อของผนังลำไส้เพื่อไปเจริญเติบโตที่ตับของ host การทดลองนี้เป็นการเลียนแบบธรรมชาติโดยใช้ แผ่นกรองสังเคราะห์ที่ใช้สำหรับเก็บเซลล์ไลน์มาใช้ในการทดลองนี้ พยาธิระยะ NEJs หลังจากฟักออกจาก เปลือกไข่ถูกนำเก็บมาใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ M-199 media โดยนำพยาธิใบไม้ตับ ระยะ NEJs 50 ตัว ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 ml ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารใช้ในการทดสอบดัง ตารางที่ 3.1 ในปริมาณ 5 ml นำไป incubate ในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 2 ชม. หลังจากนั้นนำมาพยาธิ พร้อมอาหารเลี้ยงเชื้อเทใส่ 6-well-plate ที่มี excystment tower บ่ม 12 ชม. หลังจากนั้นคำนวณหา เปอร์เซ็นต์การไชผ่านจากสมการที่ 1

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการไชของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs ผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ (Excystment tower) ระหว่าง triclabendazole (TCZ) และสารสกัดหยาบ (PI) และสารสกัด plumbagin (PB) จากรากเจตมูลเพลิงแดงความเข้มข้นต่างๆ ในหลอดทดลอง

กลุ่มที่	สารที่ได้รับ
1	Negative control (0.1% DMSO)
2-4	TCZ/ PB/ PI ที่ความเข้มข้น 0.001 µg/ml
5-7	TCZ/ PB/ PI ที่ความเข้มข้น 0.01 µg/ml
8-10	TCZ/ PB/ PI ที่ความเข้มข้น 0.1 µg/ml
11-13	TCZ/ PB/ PI ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/ml
14-16	TCZ/ PB/ PI ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml
17-19	TCZ/ PB/ PI ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml

\*หมายเหตุ พยาธิในระยะ NEJ 250 ตัว/กลุ่ม (50 ตัว/ระยะเวลาที่ทดสอบ) (TCZ : triclabendazole; PB: plumbagin และ PI : *Plumbago indica* root extract )

สมการที่ 1 Percentage of larval migration inhibition (%LMI)

$$\%LMI = \frac{(\text{จำนวนพยาธิในกลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนพยาธิในกลุ่มทดลองที่ได้สาร}) \times 100}{\text{จำนวนพยาธิในกลุ่มควบคุม}}$$

\* นับเฉพาะตัวที่ผ่านตะแกรงลงมาได้เท่านั้นในทุกกลุ่ม ในการคำนวณ

3.2.2.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดของพยาธิใบไม้ตับ *F.gigantica* ทั้งระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์

พยาธิทั้งระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม โดยใช้พยาธิในระยะ NEJs 250 ตัว/กลุ่ม (50 ตัว/ระยะเวลาที่ทดสอบ) และพยาธิระยะ 4 สัปดาห์ 50 ตัว/กลุ่ม (10 ตัว/ระยะเวลาที่ทดสอบ) โดยได้รับสารทดสอบดังตารางที่ 3.2 นำพยาธิแต่ละระยะมา incubate ใน 5% CO<sub>2</sub> เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดในตารางที่ 3.2 นำพยาธิมาส่องใต้กล้อง stereomicroscope แล้วให้คะแนนการเคลื่อนไหวตามตารางที่ 3.3 โดยใช้เกณฑ์เดียวกับการทดลองของ Kiuchi (1987) ดังสมการที่ 1 ทางด้านล่าง หลังจากนั้นนำผลไปคำนวณหาค่าการตายของพยาธิ (คะแนนเท่ากับ 0) เพื่อมาคำนวณหาค่าดัชนีการรอดของพยาธิดังสมการที่ 2 ต่อไป

**ตารางที่ 3.2** การศึกษาผลของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ *F.gigantica* ในระยะ NEJs และ ระยะ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง

กลุ่มที่*	ได้รับสาร	ระยะเวลาที่ศึกษา (ชั่วโมง)				
		1	3	6	12	24
1	กลุ่ม negative control (0.1% DMSO)					
2	กลุ่ม positive control (TCZ 100 µg/ml)					
3	กลุ่ม Plumbagin (PB) 1 µg/ml					
4	กลุ่ม Plumbagin (PB) 10 µg/ml					
5	กลุ่ม Plumbagin (PB) 100 µg/ml					
6	กลุ่ม <i>Plumbago indica</i> (PI) root extract 1 µg/ml					
7	กลุ่ม <i>Plumbago indica</i> (PI) root extract 10 µg/ml					
8	กลุ่ม <i>Plumbago indica</i> (PI) root extract 100 µg/ml					

\*หมายเหตุ พยาธิในระยะ NEJs 250 ตัว/กลุ่ม (50 ตัว/ระยะเวลาที่ทดสอบ) และพยาธิระยะ 4 สัปดาห์ 50 ตัว/กลุ่ม (10 ตัว/ระยะเวลาที่ทดสอบ)

**ตารางที่ 3.3** แสดงการให้คะแนนการเคลื่อนไหวของพยาธิในระยะ NEJ และระยะ 4 สัปดาห์

Score	สำหรับระยะ NEJs of <i>F.gigantica</i>	สำหรับระยะ 4-week of <i>F.gigantica</i>
0	ไม่เคลื่อนไหวและติดสีย้อม methylene blue	ไม่เคลื่อนไหวและติดสีย้อม methylene blue
1	ไม่เคลื่อนไหว แต่ไม่ติดสีย้อม methylene blue	ไม่เคลื่อนไหว แต่ไม่ติดสีย้อม methylene blue
2	เคลื่อนไหวทั้งตัว	เคลื่อนไหวบางส่วน
3	-	เคลื่อนไหวทั้งตัว

**สมการที่ 1** Motility index (MI) =  $\frac{\sum nN}{\sum N}$

Relative motility (RM) value =  $\frac{MI_{test} \times 100}{MI_{control}}$

MI control

n = คะแนนการเคลื่อนไหวของพยาธิแต่ละตัว

N = จำนวนพยาธิ

สมการที่ 2  $\text{Survival index} = \frac{(\text{จำนวนพยาธิทั้งหมด} - \text{พยาธิที่ตาย}) \times 100}{\text{จำนวนพยาธิทั้งหมดในกลุ่ม}}$

3.2.2.3 การคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิ 50% (Half maximal inhibitory concentration: IC<sub>50</sub>)

คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิ 50% หลังจากทดลองการเคลื่อนไหวของพยาธิเป็นเวลา 24 ชม. โดยใช้โปรแกรม excel (ED50V10) เพื่อใช้คำนวณค่า IC<sub>50</sub> จากค่า RM value (การทดลองที่ 3.2.2.2)

### 3.3 ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระหว่าง triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงในสัตว์ทดลอง

โดยศึกษาว่าสารสกัดหยาบสามารถรักษาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในสัตว์ทดลองได้หรือไม่ จากการเตรียมสัตว์ในหัวข้อ 3.2.1.2 โดยสังเขปดังนี้ เริ่มจากเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยการป้อนไข่พยาธิ 30 ฟอง/หนู 1 ตัว ป้อนในหนูแฮมสเตอร์ Golden Syrian เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนัก 60-80 กรัม จำนวน 90 ตัว แบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม (10 ตัว/กลุ่ม) โดยแต่ละตัวได้รับ metacercaria จำนวน 30 เม็ด โดยผ่านทางปาก (พยาธิจะออกมาประมาณ 15 ตัว จากที่ป้อนไข่ 30 ฟอง) หลังจากนั้น 5 วันป้อนสารสกัดหรือยาที่นำมาทดสอบ เลี้ยงหนูครบ 4 สัปดาห์ ได้พยาธิระยะตัวเต็มวัย (ตารางที่ 3.4) โดยโครงการวิจัยได้รับการรับรองการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองตามเลขที่ 5/2560 นำหนูทั้งหมดมาฆ่าด้วยวิธีเมตตาฆาต โดยจับสัตว์ทดลองตามหลักการควบคุมสัตว์ทดลอง แล้วฉีด pentobarbital เกินขนาด 2-3 เท่าของขนาด สังเกตสัตว์ไม่สามารถเคลื่อนไหว ทำการตรวจสอบการรับรู้ความรู้สึก จากการจิกเล็บ ไม่มีการตอบสนอง แสดงว่าสัตว์หลับลึก เก็บตับ แล้วเก็บพยาธิจากเนื้อตับ นำมาล้างด้วย 0.85% NaCl นับจำนวนพยาธิแล้วหาค่าเฉลี่ยของจำนวนพยาธิในแต่ละกลุ่ม นำมาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การป้องกันดังสมการที่ 3 ทำการทดลองซ้ำสองครั้ง

ตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระหว่าง triclabendazole และ สารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อพยาธิ

กลุ่มที่*		จำนวนสัตว์ทดลองในกลุ่ม
Negative control (0.1% DMSO)		10
Positive control (TCZ 100 mg/kg)		10
PB (mg/Kg)	10	10
	25	10
PI (mg/Kg)	10	10
	25	10
	100	10
	250	10
	500	10

\*หมายเหตุ (TCZ : triclabendazole; PB: plumbagin และ PI : *Plumbago indica* root extract )

### สมการที่ 3

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

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

### 3.4 ศึกษาเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิ ที่เกิดจากผลของยาฆ่าพยาธิ triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด Scanning electron microscope (SEM)

นำพยาธิหลังการทดลองที่ 3.2.2.2 เพื่อหาค่าความสัมพันธ์ของการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิเสร็จแล้ว นำพยาธิ 5 ตัวในแต่ละกลุ่มมาเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด โดยนำพยาธิทุกกลุ่มมาทำความสะอาดด้วย 0.85% NaCl แล้ว fix ด้วย Karnovsky's fixative solution เป็นเวลา 12 ชม. ล้างด้วย 0.1 M PBS solution แล้ว post-fix ด้วยสารละลาย 2% OsO<sub>4</sub> 1 อย่างน้อย 2 ชม. แล้วล้างด้วย 0.1 M PBS solution แล้วผ่านการดึงน้ำออก โดยใช้ 70%,80%,90%,95%

และ 100% ethanol solution หลังจากนั้นนำตัวอย่างผ่านเครื่องให้แห้งที่อุณหภูมิวิกฤต ฉาบทองแล้วส่ง  
ดูการเปลี่ยนแปลงผิวของพยาธิในแต่ละกลุ่ม

#### สถานที่ทำการทดลอง

- 1) ห้องวิจัยกลุ่มกายวิภาคศาสตร์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 2) หน่วยสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 3) ห้องปฏิบัติการของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 4) สถานที่เลี้ยงหอยน้ำจืด คือ คณะสหเวชศาสตร์ ม.บูรพา





## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

**วัตถุประสงค์ที่ 1** เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระหว่าง triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

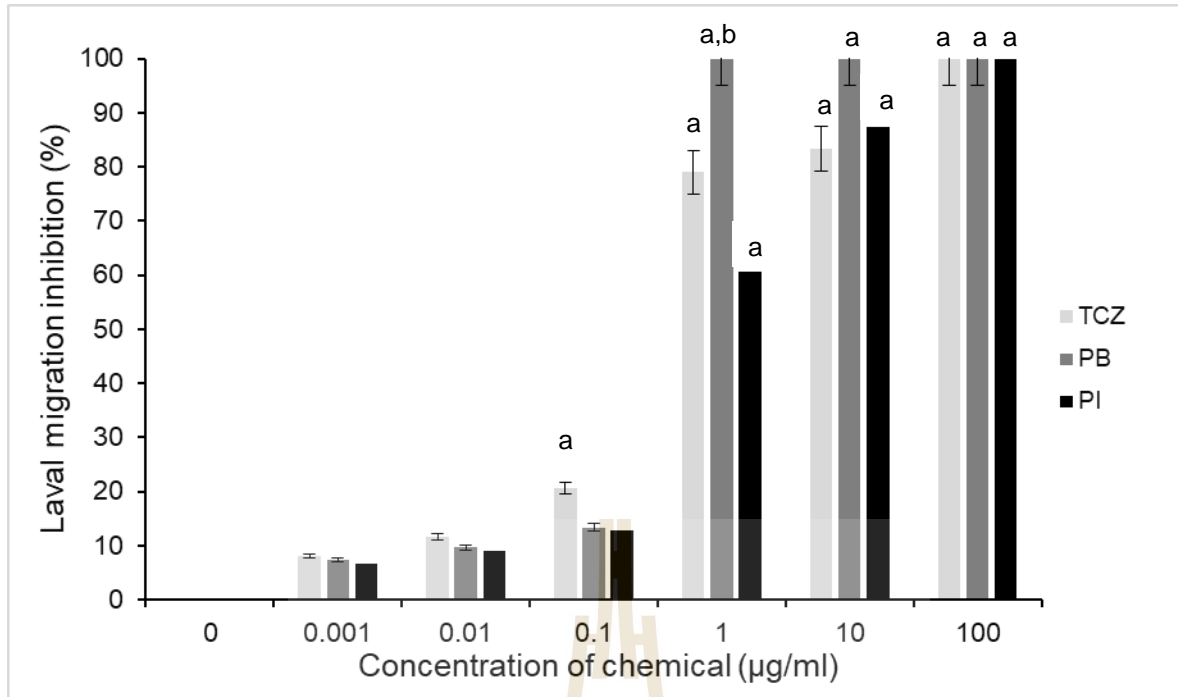
#### 4.1 สารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง

หลังจากคำนวณหาค่า % yield ของสารสกัดหยาบเท่ากับ 9.20 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักของรากเริ่มต้น 100 g (โดยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้มีการศึกษาสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงด้วย HPLC โดยใช้ plumbagin ที่ความเข้มข้น 1, 10, 12.5, 25 และ 50 ppm เป็น standard พบว่าสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงมีปริมาณ plumbagin ปริมาณเท่ากับ 3.02 ppm)

#### 4.2 การศึกษาการยับยั้งการไชของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs โดยอาศัย Excystment tower

หลังจากวิเคราะห์ผลร้อยละการไชผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs โดยเปรียบเทียบระหว่างสาร triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) กับกลุ่มควบคุมที่ปราศจากสารเคมี (ความเข้มข้นเท่ากับ 0 µg/ml) ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.1 กลุ่มที่ได้รับสาร TCZ , PB และ PI ยับยั้งพยาธิในการไชผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µg/ml ของสารทั้งสามชนิด และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารทั้งสามชนิดพบว่า PB ให้ผลยับยั้งการไชผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ของพยาธิดีที่สุด ทั้งสามเข้มข้น (LMI =100%) ในขณะที่ TCZ ให้ผลรองลงมา (LMI = 79%, 83% และ 100%) และ PI ให้ผลยับยั้งการไชผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ของพยาธิน้อยที่สุด (LMI = 71%, 87% และ 100%) แม้ว่าสาร PI มีผลต่อการไชผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ของพยาธิน้อยกว่า TCZ แต่มีผลยับยั้งการไชผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ของพยาธิใกล้เคียงกับ TCZ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณความสามารถของ TCZ, PB และ PI ในยับยั้งไชผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ของพยาธิได้ 50% ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ 1.04, 0.73 และ 0.88 µg/ml เรียงตามลำดับ





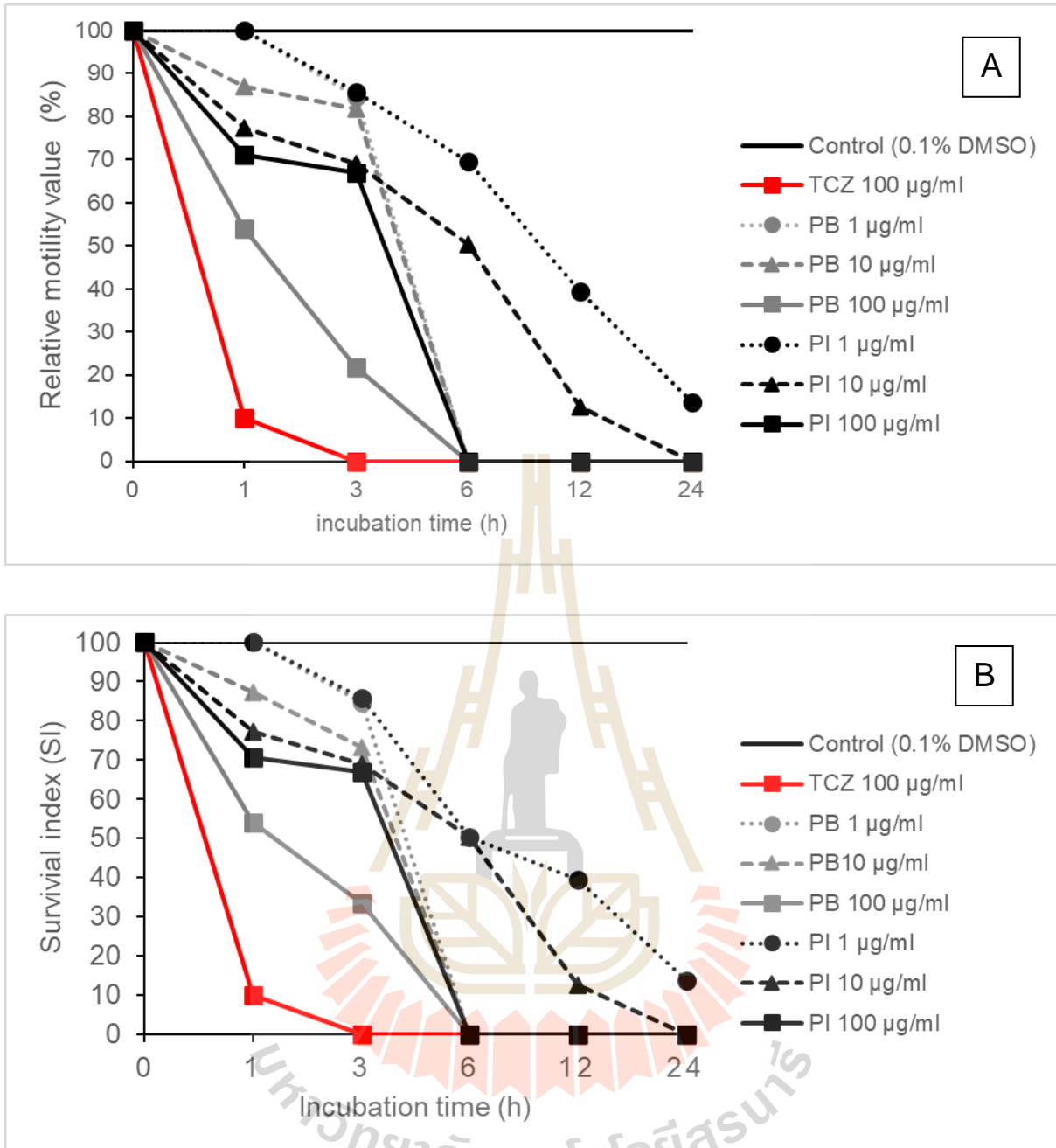
รูปที่ 4.1 ร้อยละของการยับยั้งการไชของพยาธิผ่านเยื่อเลือกผ่านสังเคราะห์ (% Laval migration inhibition, LMI) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ newly excysted juveniles (NEJs) ที่ได้รับ triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) มีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารต่างๆกับกลุ่มควบคุม (a) และ (b) ใช้แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง TCZ, PB และ PI ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) แต่ละหน่วยของกราฟแท่งแสดงใช้พยาธิ 50 ตัว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 4.3 ศึกษาผลของสารสกัดหายาจากรากเจตมูลเพลิงต่อการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs และ ระยะ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง

##### 4.3.1 พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ Newly excysted juveniles (NEJs)

เมื่อทดสอบสารทั้ง triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) เทียบกับกลุ่มควบคุมของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในระยะ NEJs โดยสังเกตการเคลื่อนไหวและการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิที่ 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2A และ B) พบว่ากลุ่มควบคุม เคลื่อนไหวได้ดีและมีมีดัชนีการมีชีวิตรอดทุกตัว โดยแสดงจากค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (relative motility RM values) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการทดลองชั่วโมงที่ 24 (RM = 100%, SI = 100%) ซึ่งถือว่า 0.1% DMSO ไม่ได้ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิในระยะ NEJs ส่วนกลุ่ม positive control เป็นยา TCZ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็น positive control เทียบกับ PB และ PI ซึ่งพบว่า TCZ มีผลทำให้การเคลื่อนไหวลดลงถึง 90% และพยาธิยังมีชีวิตรอดอยู่เพียง 10% ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 (RM = 10%, SI = 10%) หลังจากนั้นพยาธิทั้งหมดไม่เคลื่อนไหวและตาย ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 เป็นต้นไป (RM = 0%, SI = 0%) ส่วน

พยาธิได้รับสาร PB ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  เรียงตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น เป็นสัดส่วนผกผันกับการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดของพยาธิ โดยมีรายละเอียดดังนี้ ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  ของ PB พยาธิเริ่มมีการเคลื่อนไหวลดลง 15% และมีการตายเกิดขึ้น 15% (RM = 85%, SI = 85%) ในชั่วโมงที่ 3 หลังจากนั้นพยาธิไม่เคลื่อนไหวและพบว่าตายทั้งหมด (RM = 0%, SI = 0%) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงสิ้นสุดการทดลอง แล้วเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PB เท่ากับ 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวของพยาธิตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และการเคลื่อนไหวลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 3 และไม่เคลื่อนไหวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป โดยพยาธิที่ได้รับ PB 10  $\mu\text{g/ml}$  มีการเคลื่อนไหวลดลง 23-28% มีการตายเกิดขึ้น 23-37% ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 1 และ 3 ส่วนพยาธิที่ได้รับ PB ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  มีการเคลื่อนไหวลดลงและพบว่ามีตายเกือบ 50% (RM = 54%, SI = 54%) เมื่อผ่านไป 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นพยาธิไม่ค่อยเคลื่อนไหว และมีตายเพิ่มมากขึ้นถึง 63% เมื่อผ่านเข้าสู่ชั่วโมงที่ 3 หลังชั่วโมงที่ 6 พยาธิไม่เคลื่อนไหวแต่ตายหมด (RM= 0%, SI= 0%) เมื่อเปรียบเทียบผลของ TCZ กับ PB ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าผลของ TCZ ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิมากกว่า PB ในช่วง 1-3 ชั่วโมงแรก หลังได้รับสารเท่านั้น ส่วนฤทธิ์ของ PB สามารถเทียบเคียงกับ TCZ ได้ โดยออกฤทธิ์ฆ่าพยาธิได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป ส่วนสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง (PI) ออกฤทธิ์คล้ายกับ PB เมื่อเพิ่มความเข้มข้นและเพิ่มระยะเวลา โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ พยาธิที่ได้รับ PI ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวที่ชั่วโมงที่ 3 และส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิอย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่าการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงเกิน 50% และมีการตายถึง 61% (RM=39%, SI=39%) เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพยาธิระยะ NEJs มีการเคลื่อนไหวเพียงเล็กน้อยและมีการรอดชีวิตเพียง 14 % (RM =14%, SI =14%) แล้วเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PI เท่ากับ 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวของพยาธิประมาณ 20-30% และมีการตายประมาณ 20% ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และไม่เคลื่อนไหวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป โดยพยาธิที่ได้รับ PB 10  $\mu\text{g/ml}$  มีการเคลื่อนไหวลดลง 23-28% มีการตายเกิดขึ้น 23-37% ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 1 และ 3 เรียงตามลำดับ พยาธิเคลื่อนไหวน้อยลงจนสิ้นสุดการทดลองพบว่าพยาธิไม่มีการเคลื่อนไหวและตายหมด (RM= 0%, SI= 0%) ส่วนพยาธิที่ได้รับ PB ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิและการรอดชีวิตของพยาธิ โดยพบว่าพยาธิเคลื่อนไหวลดลงอย่างรวดเร็วในระยะแรกๆของการทดลองและพบว่าพยาธิตายทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบผลของ PI กับ TCZ และ PB ที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่าฤทธิ์ของ TCZ ออกผลดีที่สุด รองลงมาคือ PB และสุดท้ายคือ PI ในช่วง 3 ชั่วโมงแรก ถึงอย่างไรก็ตาม PI สามารถฆ่าพยาธิระยะ NEJs ได้เช่นเดียวกับ TCZ และ PB หลัง 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป เมื่อเปรียบเทียบผลของ PI กับ PB ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ณ เวลาเดียวพบว่า PB มีผลต่อการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิระยะ NEJs มากกว่า PI

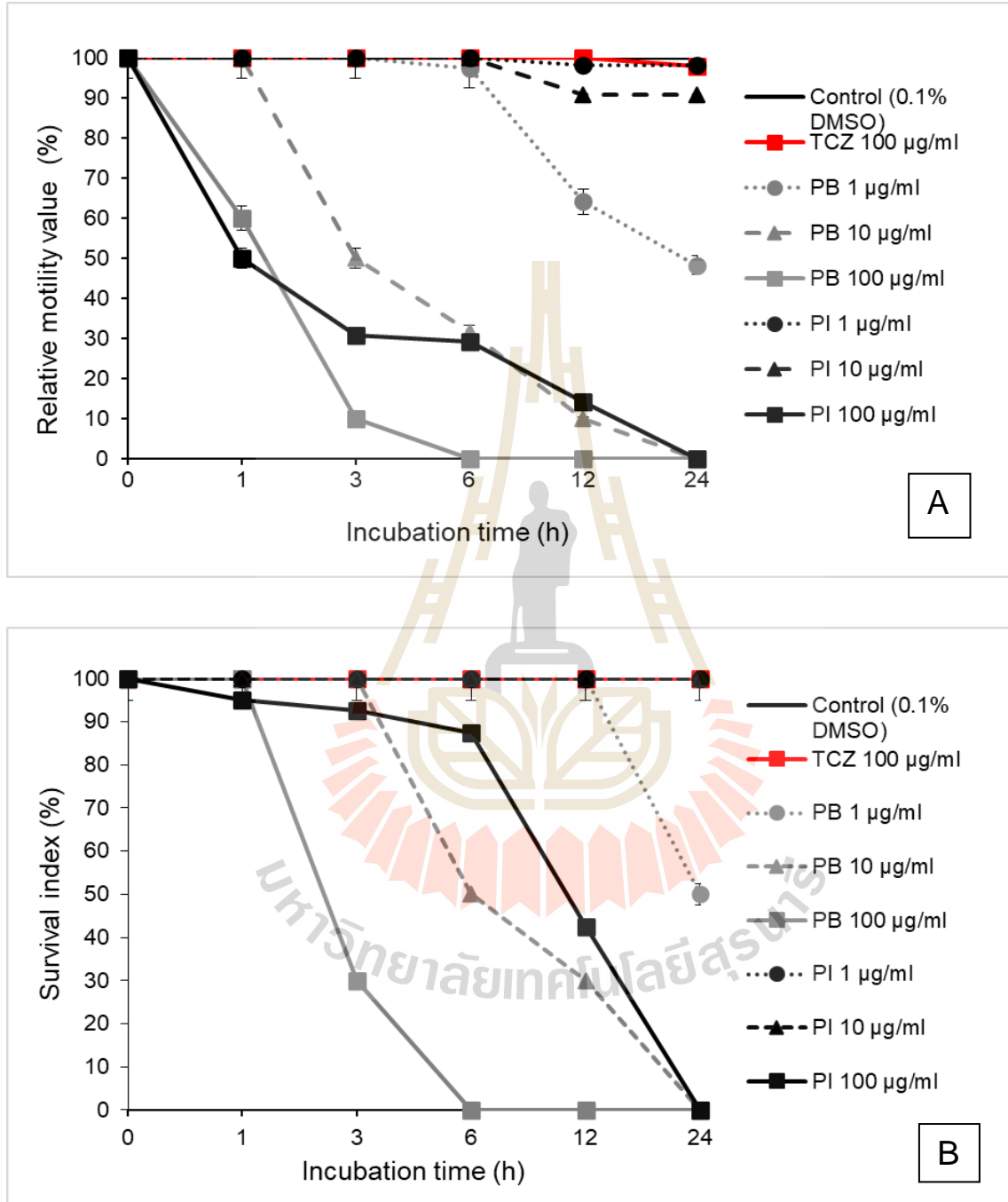


รูปที่ 4.2 ร้อยละของการความสัมพัทธ์การเคลื่อนไหว (A) และดัชนีการรอดชีวิต (B) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ newly excysted juveniles (NEJs) หลังที่ได้รับ triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเทียบกับเวลา โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (\*  $P < 0.05$ ; n = 50/จุด) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 4.3.2 พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ 4 สัปดาห์

เมื่อทดสอบสารทั้ง triclobandazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) เทียบกับกลุ่มควบคุมของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในระยะ 4 สัปดาห์ สังเกตการเคลื่อนไหวและการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิที่ 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3) พบว่าพยาธิในกลุ่มควบคุมเคลื่อนไหวได้ดีและมีดัชนีการชีวิตรอดทุกตัว โดยแสดงจากค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (relative motility- RM values) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการทดลองชั่วโมงที่ 24 (RM = 100%, SI = 100%) ซึ่งถือว่า 0.1% DMSO ไม่ได้ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิในระยะ 4 สัปดาห์ กลุ่มพยาธิที่ได้รับยา TCZ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่าตลอดการทดลอง TCZ มีผลต่อการเคลื่อนไหวเพียงแค่ 2% และมีการรอดชีวิตของพยาธิ 100% (RM = 98%, SI = 100%) ส่วนพยาธิระยะ 4 สัปดาห์ ที่ได้รับสาร PB ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µg/ml เรียงตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นเป็นสัดส่วนผกผันกับการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดของพยาธิ โดยมีรายละเอียดดังนี้ ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml ของ PB ไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิ ใน 6 ชั่วโมงแรก เริ่มเห็นมีการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงอย่างเด่นชัดถึง 36% ที่ชั่วโมงที่ 12 แต่พยาธิทั้งหมดยังมีชีวิตอยู่ 100% (RM = 64%, SI = 100%) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าพยาธิเคลื่อนไหวลดลงและมีดัชนีการรอดชีวิตเพียง 50% (RM = 48%, SI = 50%) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร PB เท่ากับ 10 และ 100 µg/ml ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิ ทำให้พยาธิเคลื่อนไหวน้อยลงในช่วงระยะที่สังเกตเร็วขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 10 µg/ml พบว่าพยาธิมีการเคลื่อนไหวเพียง 50% แต่พยาธิทั้งหมดยังไม่ตาย (RM = 50%, SI = 100%) พยาธิมีการเคลื่อนไหวลดลงอย่างต่อเนื่องและมีการรอดชีวิตน้อยลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น จนถึงสิ้นสุดการทดลองพบว่าพยาธิไม่เคลื่อนไหวและตายทั้งหมด (RM = 0%, SI = 0%) ส่วนพยาธิที่ได้รับสาร PB 100 µg/ml ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันกับ PB ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml แต่เห็นผลต่อการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิ ในระยะแรกๆของการทดลอง ซึ่งการเคลื่อนไหวของพยาธิเหลือเพียง 60% ในชั่วโมงที่ 1 และเหลือเพียง 10% ชั่วโมงที่ 3 เรียงตามลำดับ พบว่ามีการรอดชีวิตเหลือเพียง 30% ในชั่วโมงที่ 3 (RM = 10%, SI = 30%) และชั่วโมงที่ 6 พยาธิทุกตัวไม่เคลื่อนไหวและการรอดเท่ากับศูนย์ (RM = 0%, SI = 0%) เมื่อเปรียบเทียบผลของ TCZ กับ PB ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าผลของ PB ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิมากกว่า TCZ ตลอดการทดลอง ส่วนพยาธิระยะ 4 สัปดาห์ ที่ได้รับสาร PI ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µg/ml เรียงตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นเป็นสัดส่วนผกผันกับการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดของพยาธิ โดยมีรายละเอียดดังนี้ ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ของ PI พบว่า PI มีผลต่อการเคลื่อนไหวเพียงแค่ 2%-9% และมีการรอดชีวิตของพยาธิมากกว่า 90% แล้วเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PI เท่ากับ 100 µg/ml ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิเหลือเพียง 50% อย่างไรก็ตามพยาธิยังมีชีวิตอยู่ถึง 95% หลังจากนั้นการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องจากชั่วโมงที่ 3 ถึงชั่วโมงที่ 12 และไม่เคลื่อนไหวและพยาธิมีการรอดเท่ากับศูนย์ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเปรียบเทียบผลของ PI กับ TCZ และ PB ในพยาธิ 4 สัปดาห์ที่ความเข้มข้น

เดียวกันพบว่าฤทธิ์ของ PB ออกผลดีที่สุด รองลงมาคือ PI และสุดท้ายคือ TCZ ในทุกช่วงเวลา แม้ว่า PB มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิและการรอดชีวิตของพยาธิมากกว่า PI ถึงอย่างไรก็ตาม PI สามารถฆ่าพยาธิระยะ 4 สัปดาห์ ได้เช่นเดียวกับ PB เมื่อสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 4.3 ร้อยละของการความสัมพัทธ์การเคลื่อนไหว (A) และดัชนีการรอดชีวิต (B) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ 4 สัปดาห์ หลังที่ได้รับ triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเทียบกับเวลา โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (\*  $P < 0.05$ ;  $n=10$ /จุด) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

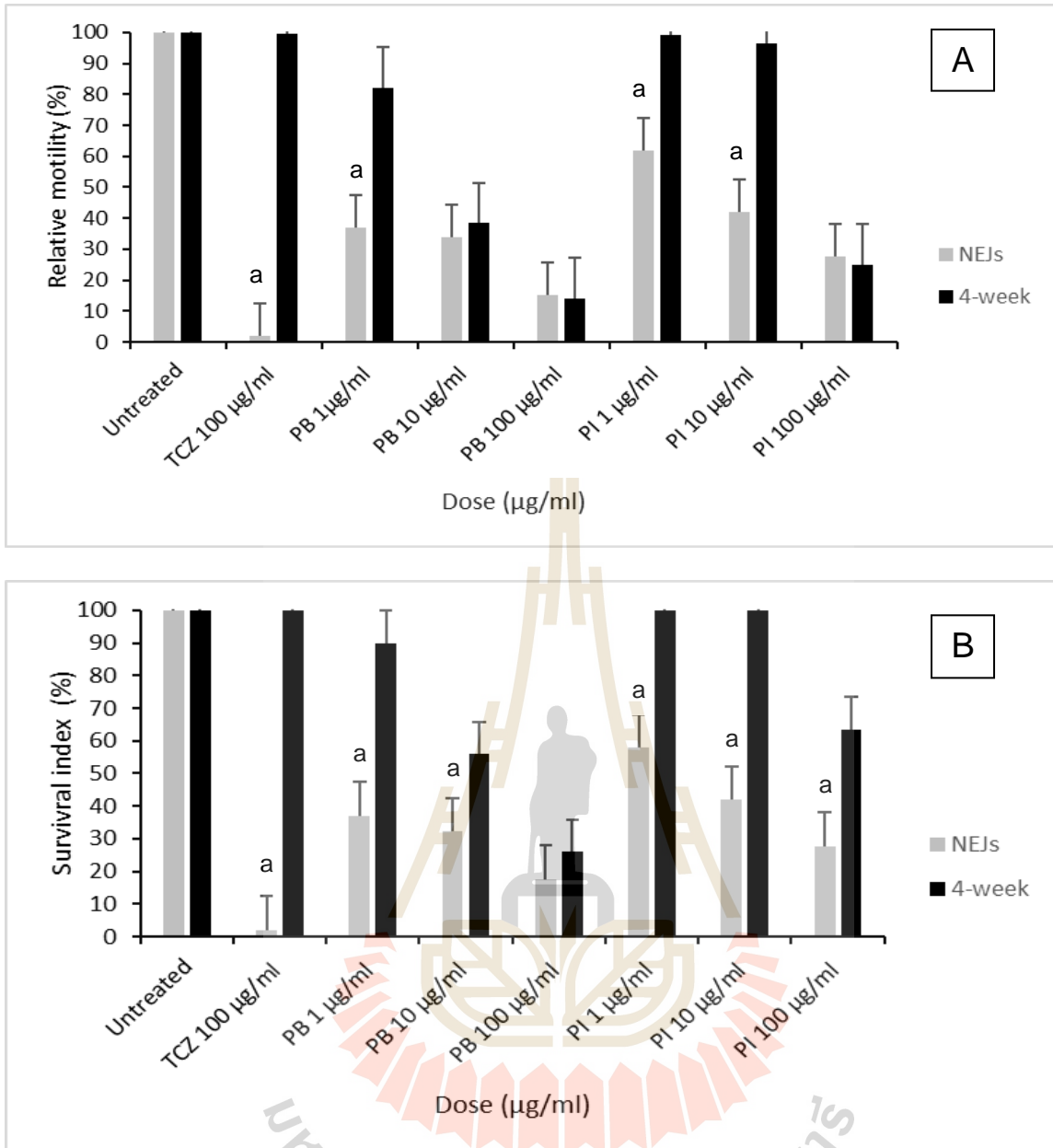


#### 4.3.3 เมื่อเปรียบเทียบช่วงอายุของพยาธิต่อการตอบสนองต่อสารที่นำมาทดสอบ

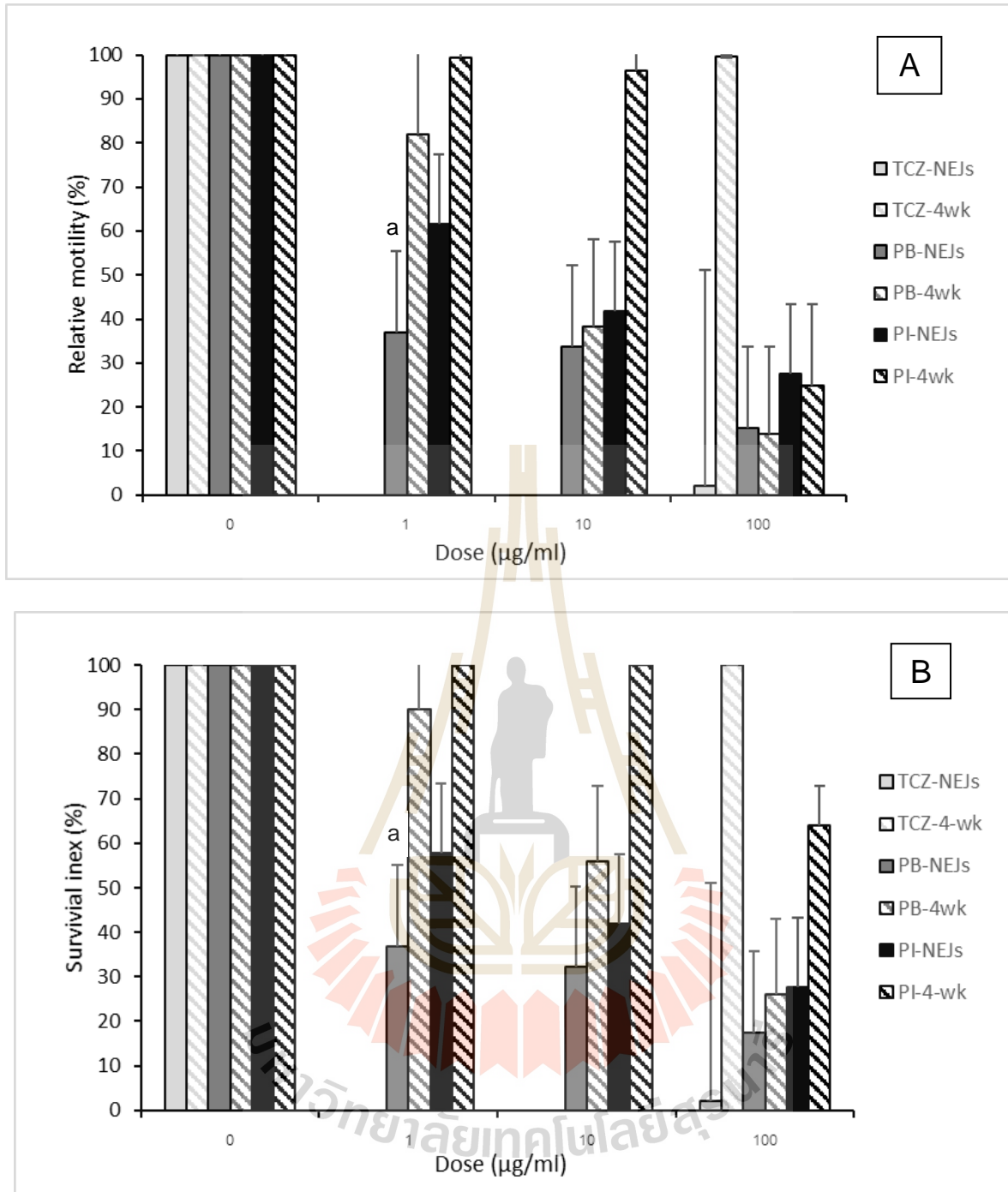
เปรียบเทียบช่วงอายุต่อการตอบสนองต่อสารที่นำมาทดสอบในพยาธิระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ โดยนำค่า RM และ SI ของกลุ่มที่ได้รับ PB หรือ PI เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ TCZ (รูปที่ 4.4) พบว่าพยาธิที่ได้รับ TCZ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิและค่าดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิในระยะเวลา NEJs ได้มากกว่าระยะ 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าพยาธิที่ได้รับ PB ที่ความเข้มข้น 0.1 µg/ml ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิและดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิในระยะเวลา NEJs มากกว่าระยะ 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยกเว้นที่ความเข้มข้น 10 และ 100 µg/ml ของ PB ต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิ พยาธิเคลื่อนไหวได้น้อยลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนพยาธิที่ได้รับ PI ทุกความเข้มข้น ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิและค่าดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิในระยะเวลา NEJs ได้มากกว่าระยะ 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับ PB ยกเว้นความเข้มข้น 100 µg/ml ของ PI ที่ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิในทั้งสองระยะ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่นำมาทดสอบในพยาธิระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ โดยนำค่า RM และ SI ของกลุ่มที่ได้รับ PB หรือ PI เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ TCZ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (รูปที่ 4.5) พบว่า TCZ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิและค่าดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิ ในระยะเวลา NEJs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่ไม่มีผลต่อพยาธิในระยะ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ PB มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิและดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิทั้งสองระยะ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่า PI จะมีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิทั้งระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ แต่ไม่ส่งผลต่อดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิในระยะ 4 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ





รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ช่วงอายุของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* พยาธิที่ได้รับ triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) มีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเกี่ยวกับการเคลื่อนไหว (A) และดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิ (B) โดยแสดงออกมาในรูปค่า mean  $\pm$  SE ของช่วงเวลาทดสอบ ซึ่งค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างพยาธิระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ (a,  $P < 0.05$ )

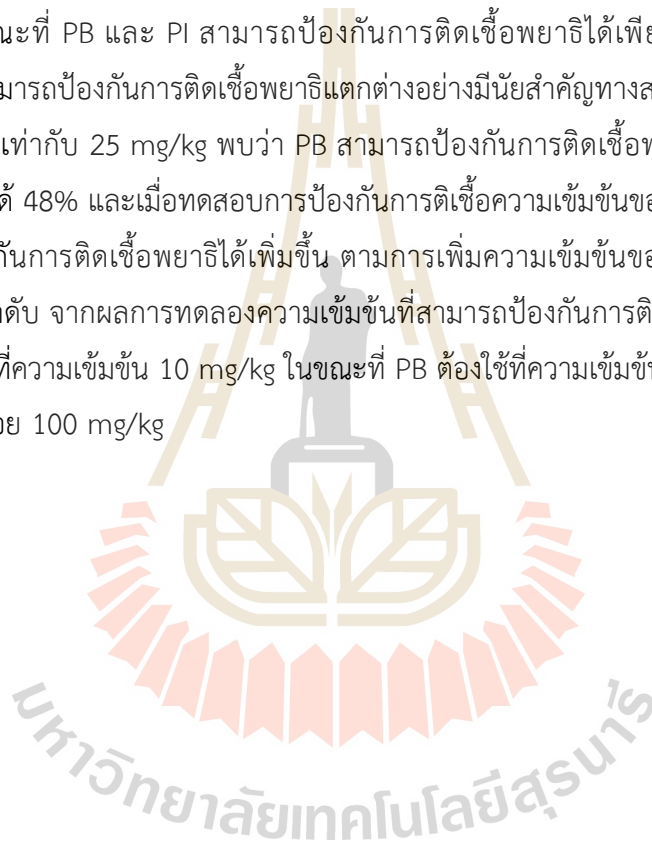


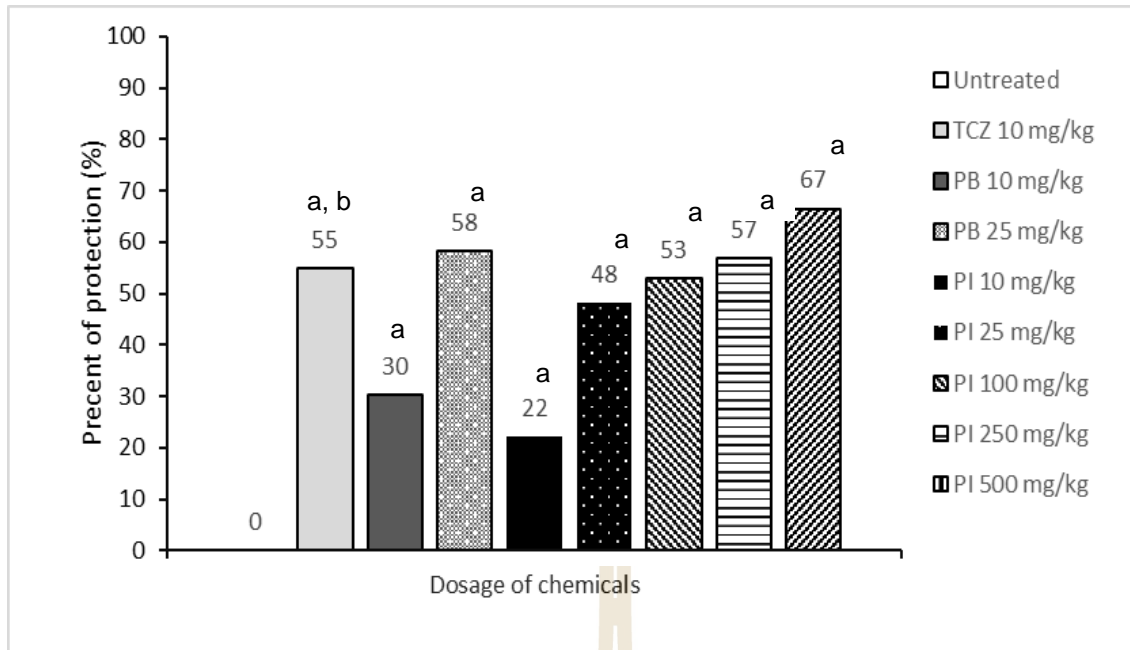
รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ TC triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) มีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ เทียบกับการเคลื่อนไหวและดัชนีการรอดชีวิตของพยาธิ โดยแสดงออกมาในรูปค่า mean  $\pm$  SE ของช่วงเวลาทดสอบ ซึ่งค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างพยาธิระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ (a,  $P < 0.05$ )



#### 4.4 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระหว่าง triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงในสัตว์ทดลอง

หลังจากป้อนพยาธิในหนูแฮมสเตอร์แล้ว ได้รับสาร triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) ที่ความเข้มข้นต่างๆเทียบกับกลุ่มควบคุม (ความเข้มข้นเท่ากับ 0 µg/ml) โดยแสดงออกมาในรูปร้อยละการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ (percentage of protection) (รูปที่ 4.6) โดยมีรายละเอียดดังนี้ ทั้ง TCZ , PB และ PI ทุกความเข้มข้น สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบ ร้อยละการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ กลุ่มที่ได้รับสาร TCZ , PB และ PI ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันพบว่า TCZ มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้ดีที่สุดถึง 55% ในขณะที่ PB และ PI สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้เพียง 30% และ 22% เรียงตามลำดับ โดย TCZ สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ PB และ PI เท่ากับ 25 mg/kg พบว่า PB สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้ถึง 58% ซึ่งให้ผลดีกว่า PI ที่ยับยั้งพยาธิได้ 48% และเมื่อทดสอบการป้องกันการติดเชื้อพยาธิความเข้มข้นของ PI เป็น 100, 250 และ 500 mg/kg พบว่าป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้เพิ่มขึ้น ตามการเพิ่มความเข้มข้นของ PI เท่ากับ 53%, 57% และ 67 % เรียงตามลำดับ จากผลการทดลองความเข้มข้นที่สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้ 50 % ของสารแต่ละชนิดคือ TZC ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg ในขณะที่ PB ต้องใช้ที่ความเข้มข้น 25 mg/kg และ PI ต้องใช้ที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 100 mg/kg





รูปที่ 4.6 ร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ที่ได้รับ triclabendazole (TCZ), plumbagin (PB) และ *Plumbago indica* root extract (PI) มีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารต่างๆกับกลุ่มควบคุม (a) และ (b) ใช้แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง TCZ, PB และ PI ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) แต่ละหน่วยของกราฟเป็นค่าเฉลี่ยของพยาธิที่พบ หลังได้รับสารแต่ละชนิด ( $n = 10$  ตัว/กลุ่ม) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

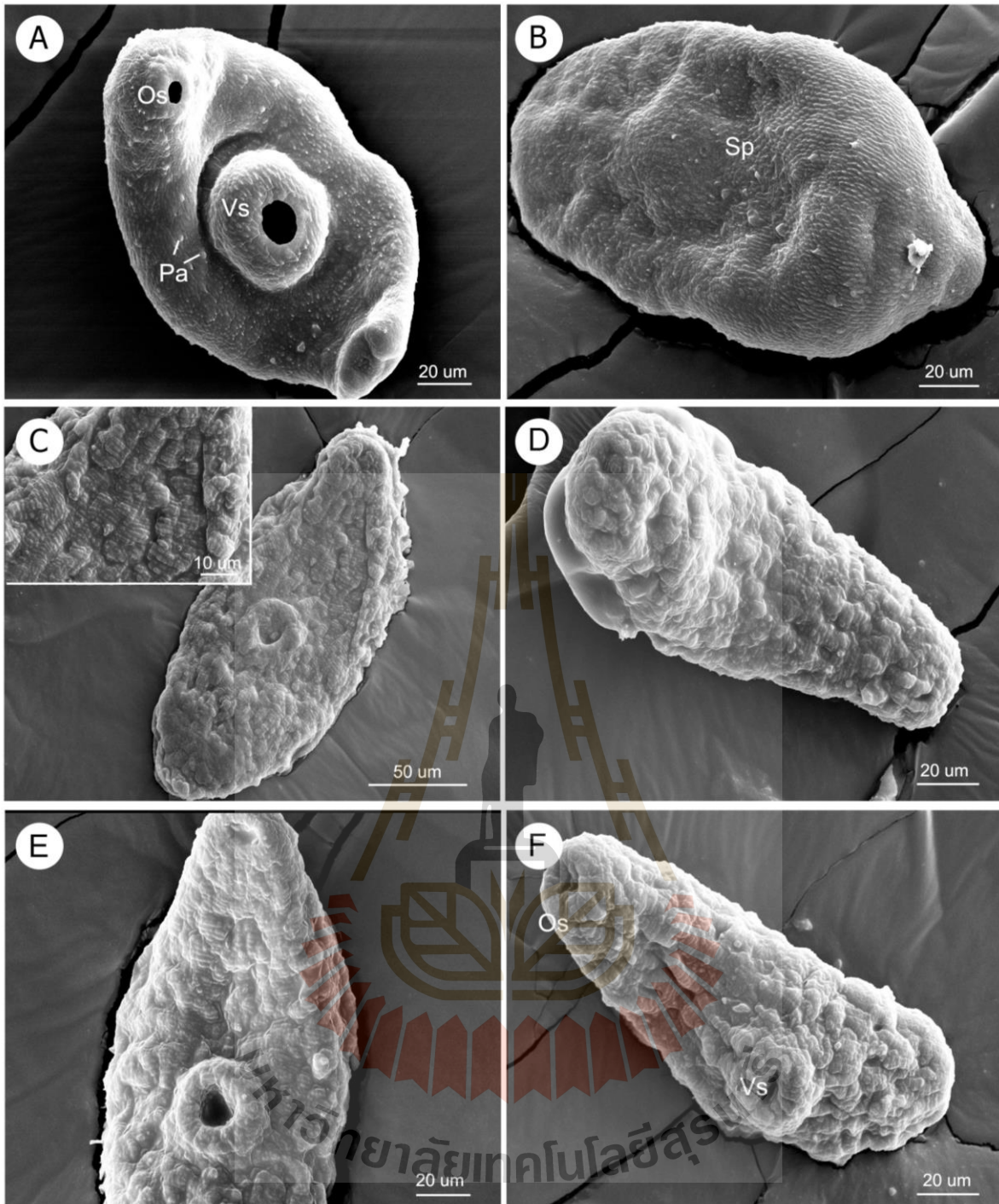
วัตถุประสงค์ที่ 2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิ ที่เกิดจากผลของยาฆ่าพยาธิ triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

#### 4.5 ผลการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิ ที่เกิดจากผลของยาฆ่าพยาธิ triclabendazole และสารสกัดหยาบและสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด Scanning electron microscope (SEM)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิหลังทดสอบสารทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 1 และ 10  $\mu\text{g/ml}$  เทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลาย 0.1% DMSO (รูปที่ 4.7) มีสัณฐานภายนอกประกอบด้วยผิวหนัง (tegument) ที่เป็นหนาม (spines) ปกคลุมผิวปนกับตุ่มรับความรู้สึก (sensory papillae) กระจายอยู่ที่บริเวณทางด้านท้อง (ventral surface) และทางด้านหลัง (dorsal surface) โดยจะพบ sensory papillae รอบๆบริเวณปาก (oral sucker) และรอบๆตุ่มดูดด้านท้อง (ventral sucker) ด้านท้องเป็นส่วนใหญ่ และจำนวน sensory papillae จะลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งสิ้นสุดบริเวณหาง หนามจะมีขนาดเล็กปกคลุมหนาแน่น โดยเฉพาะบริเวณส่วนหัว บริเวณลำตัวหนามจะมีขนาดใหญ่และยาวที่สุด และหนามจะมีขนาดเล็กเมื่ออยู่ใกล้

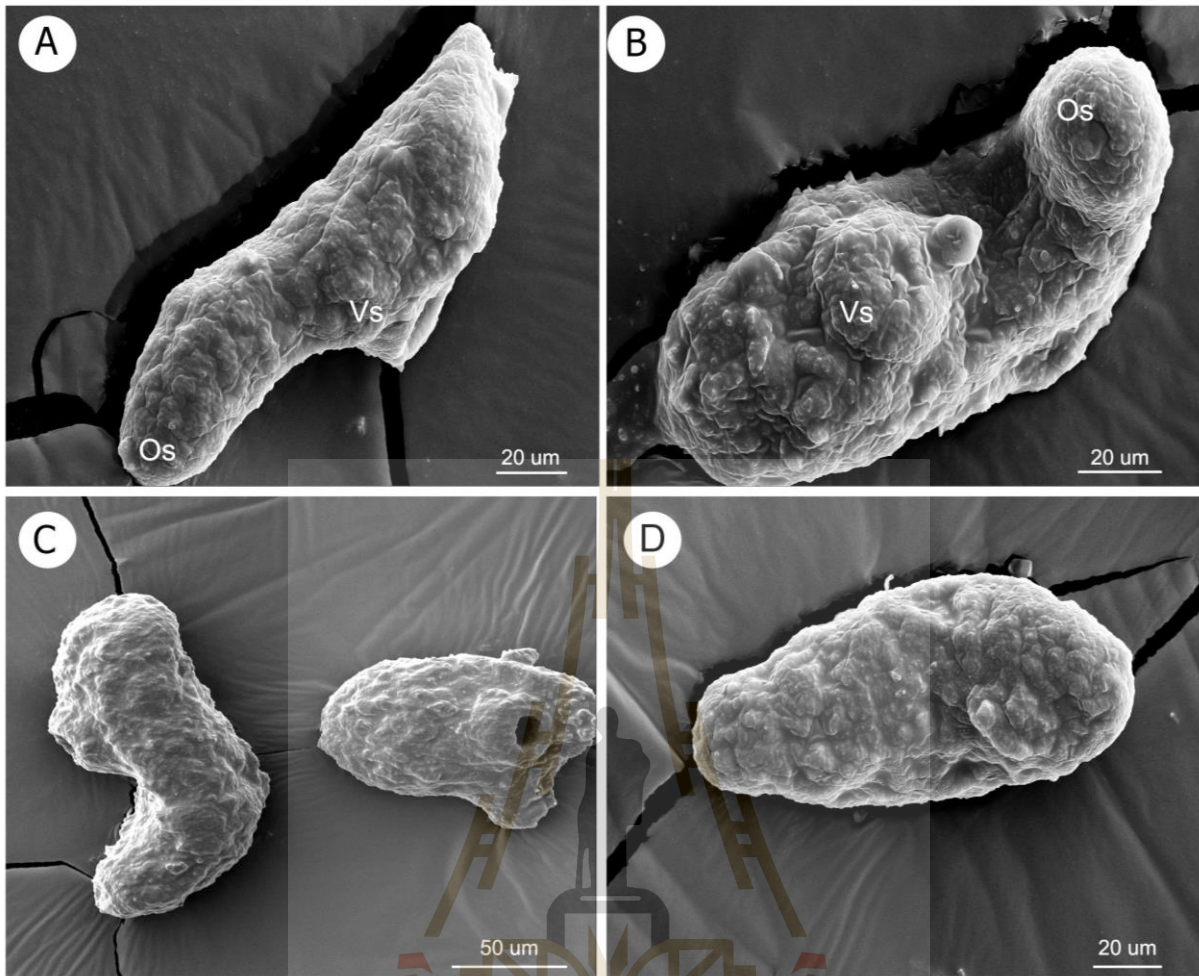
ทาง ในกลุ่มพยาธิที่ได้รับ TCZ, PB และ PI ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ณ ที่ 12 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7-4.8) มีการเปลี่ยนแปลงผิวของพยาธิระยะ NEJs ชัดเจน พบว่ามีการหลุดลอกส่วน tegument ทั้งตัว จนไม่เห็นส่วนที่เป็น tegument and sensory papillae โดยเห็นเฉพาะโครงสร้างที่อยู่ลึกลงต่อ tegument เท่านั้น

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิหลังทดสอบสารทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เทียบกับ กลุ่มควบคุม ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าพยาธิใบไม้ตับ *F.gigantica* ระยะ 4 สัปดาห์ ในกลุ่มที่ได้รับ 0.1% DMSO หลังสิ้นสุดการทดลอง ตัวพยาธิมีลักษณะเป็นรูปใบไม้ ปกคลุมด้วยหนามทั้งตัว ตั้งแต่ส่วนหัวถึงหาง ตัวพยาธิระยะนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือส่วนหัว ส่วนกลางลำตัวและส่วนหาง เรียงตามลำดับ ส่วนหัวของพยาธิทั้งสองด้านปกคลุมด้วย หนามมีลักษณะเด่นชัด เป็นหนามยาวและเห็นร่องลึกระหว่างหนาม ด้านท้องพบ oral sucker และ sensory papillae แทรกอยู่ระหว่างหนามของพยาธิ ส่วนกลางลำตัวทั้งสองด้านของพยาธิปกคลุมด้วยหนามขนาดใหญ่คล้ายฟันเลื่อย มีการกระจายตัวอยู่อย่างห่างๆ และพบ ventral sucker อยู่บริเวณท้องทางด้านบนของส่วนกลางลำตัว นอกจากนี้ยังพบ sensory papillae กระจายตัวอยู่รอบๆ ventral sucker ส่วนหางทั้งทางด้านท้องและทางด้านหลัง พบว่าหนามสั้นและหยาบ และยังพบ sensory papillae แทรกอยู่เล็กน้อย (รูปที่ 4.9 A-C) ส่วนพยาธิในกลุ่มที่แช่ TCZ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml มีลักษณะเป็นตุ่มพองที่บริเวณด้านข้างกลางลำตัวด้าน dorsal surface มากกว่า ventral surface และพบว่าตั้งแต่กลางลำตัวถึงส่วนหางมีการหลุดลอกของผิวพยาธิเมื่อเวลาผ่านไป ณ ชั่วโมงที่ 12 (รูปที่ 4.9 D และ E) เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงผิวของพยาธิที่แช่ใน PB และ PI ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับ TCZ พบว่ามีพยาธิสภาพคล้ายคลึงกัน ดังมีรายละเอียดดังนี้ เริ่มจากเกิดการบวมของผิวหนังพยาธิ ตามมาด้วยเกิดตุ่มพองและตุ่มพองแตก จนเกิดเป็นแผลเปิดที่ผิวหนังจนเห็นโครงสร้างใต้ชั้นผิวของพยาธิ สุดท้ายเกิดการหลุดลอกผิวของพยาธิเป็นแห่งๆ จนโครงสร้างผิวหนังของพยาธิเสียหาย เรียงตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 6 พยาธิที่ได้รับ PB ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เกิดแผลพุพองที่ส่วนหัว โดยเฉพาะที่รอบๆ oral sucker และพยาธิสภาพรุนแรงเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะกึ่งกลางลำตัวและส่วนหางทางด้าน ventral surface มากกว่า dorsal surface เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 ผิวของพยาธิเกิดตุ่มพองแตกกระจายทั้งตัว และเห็นโครงสร้างใต้ผิวหนังบ้างแห่ง ส่วนพยาธิที่ได้รับ PI ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ณ ชั่วโมงที่ 6 เกิดการบวมที่ส่วนหัวและลำตัวทั้งสองด้าน โดยเฉพาะ ventral surface เกิดพยาธิสภาพมากกว่า dorsal surface ความรุนแรงของพยาธิสภาพเพิ่มมากขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 12 ส่วนหัวของพยาธิ เกิดการฉีกขาดของผิวหนังรอบๆ หนามบริเวณส่วนหัว และเกิดตุ่มพองหลากหลายขนาดกระจายตัวอยู่ด้านข้างของกลางลำตัวและส่วนหางของพยาธิทั้งด้าน ventral และด้าน dorsal (รูป 4.9 และ 4.10)

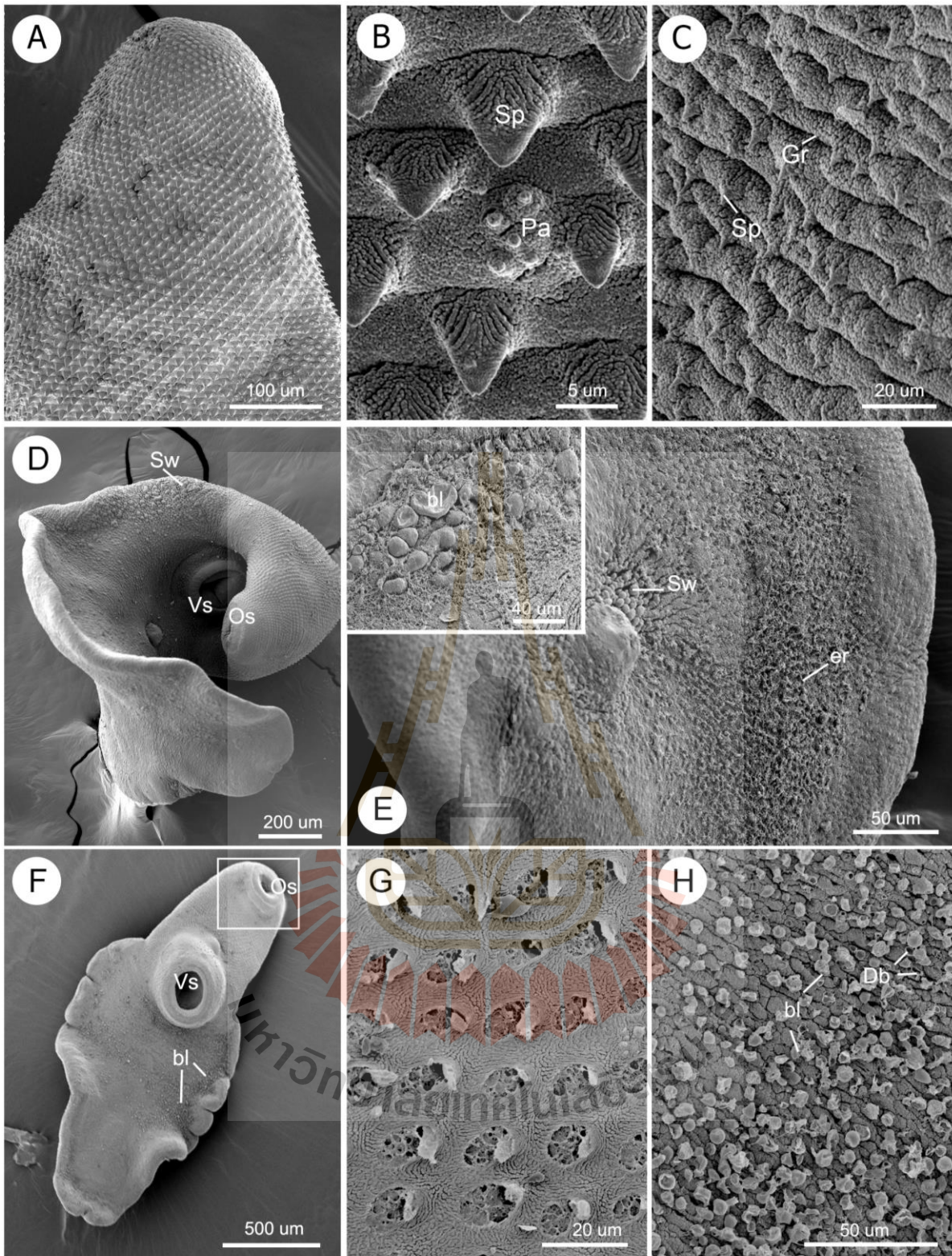


รูปที่ 4.7 ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs หลังจากได้รับสารต่าง ๆ (A-B) กลุ่มควบคุม(0.1% DMSO), (C) กลุ่มที่ได้รับ TCZ ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  มีผิวหนังบวมที่กลางลำตัว (ลูกศร) และ (D) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10  $\mu\text{g/ml}$  มีการหลุดลอกของผิวหนังพยาธิทั้งตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (E) ส่วนพยาธิในกลุ่มที่ได้รับ PB ความเข้มข้น 1 และ (F) 10  $\mu\text{g/ml}$  ที่ 12 ชั่วโมง มีผิวหนังหลุดลอกเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ TCZ



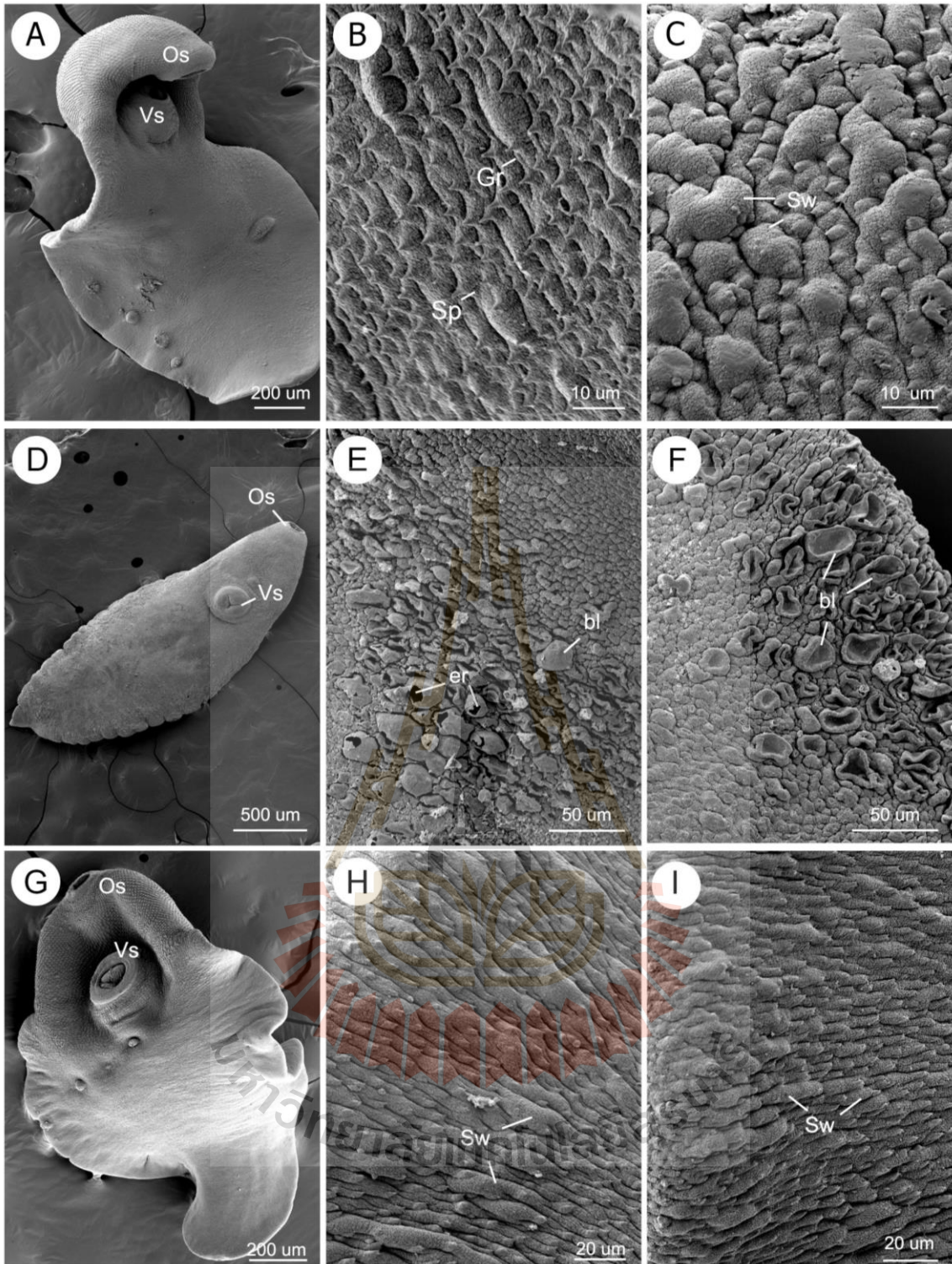


รูปที่ 4.8 ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantea* ระยะ NEJs หลังจากได้รับสาร PB ที่ 12 ชั่วโมง (A-B) พยาธิในกลุ่มที่ได้รับ PB ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  เกิดการหลุดลอกของผิวหนังทั้งทางด้านท้องและด้านหลัง (C-D) เมื่อเพิ่มความเข้มข้น PB เป็น 10  $\mu\text{g/ml}$  มีการหลุดลอกของผิวพยาธิทั้งตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ความเข้มข้น 1 และ (F) 10  $\mu\text{g/ml}$  มีผิวหลุดลอกเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ TCZ และ PB



รูปที่ 4.9 ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของพยาธิใบไม้ตัว *F. gigantea* ระยะ 4 สัปดาห์ หลังจากได้รับสารต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  (A-C) กลุ่มควบคุม(0.1% DMSO), (D-E) กลุ่มที่ได้รับ TCZ ที่ 6 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมง มีผิวหนังบวม (swelling : Sw) , ตุ่มพอง (blebbing : bl) และ เกิดการหลุดลอก (erosion ; er) ที่กลางลำตัว และ (F-H) ส่วนพยาธิในกลุ่มที่ได้รับ PI ณ ที่ 6 ชั่วโมงและ 12 เกิดการหลุดลอกของผิวที่บริเวณหนามส่วนหัวและเกิดตุ่มพองทั่วตัวเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ TCZ





รูปที่ 4.10 ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantea* ระยะ 4 สัปดาห์ หลังจากได้รับสารต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml (A-C) กลุ่มที่ได้รับ TCZ เกิดการบวมขึ้นที่ระหว่างหนามกระจายทั่วตัว โดยเฉพาะกลางลำตัว, (D-F) กลุ่มที่ได้รับ PB เกิดตุ่มพองและตุ่มพองแตกกระจายอยู่ที่กลางลำตัวไปถึงหางและ (G-I) กลุ่มที่ได้รับ PI ณ ที่ 6 ชั่วโมง เกิดการบวมของผิวหนังที่ด้านข้างของพยาธิที่กลางลำตัวไปถึงหางเช่นเดียวกับ PB

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลองและบทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

การใช้ plumbagin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ได้มาจากพืช 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Droseraceae ซึ่งพืชในวงศ์ Droseraceae จัดเป็นพืชกินแมลง (Carnivorous plant) เช่น ต้นหยาดน้ำค้าง และวงศ์ Plumbaginaceae เช่น เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) และเจตมูลเพลิงขาว (*P. zeylanica*) ยังคงเป็นที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยไม่ว่าจะเป็นการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับต้านการอักเสบ เชื้อแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง ต้านเชื้อมาเลเรีย และต้านต่อพยาธิหนอนตัวกลมและตัวแบน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า plumbagin สามารถออกฤทธิ์ใช้เป็นยาต้านพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* ทั้งระยะ NEJs และ ระยะ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลองได้ดีกว่า TCZ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าหากประยุกต์นำสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงมาศึกษาความเป็นสมุนไพรใช้ยับยั้งและกำจัดการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองได้หรือไม่ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง เทียบกับ plumbagin ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากรากเจตมูลเพลิงแดง ในขณะที่มี TCZ เป็น positive control โดยศึกษาผลของสารดังกล่าวตั้งแต่ การจำลองยับยั้งไขผ่านแผ่นเยื่อสังเคราะห์ ซึ่งเลียนแบบการไขผ่านผนังลำไส้, การเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิที่ระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะติดเชื้อและระยะโตเต็มวัยของพยาธิในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิ ซึ่งถือเป็นอวัยวะแรกในการสัมผัสกับสารที่นำมาทดสอบ ผู้วิจัยทำการสกัดสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง ซึ่งมี plumbagin เป็นสารสำคัญในรากซึ่งพบว่ามีปริมาณเพียง 9.20% ของปริมาณทั้งหมด เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบ ได้มีรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการจำแนกส่วนประกอบที่พบภายในสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงนอกจากพบ plumbagin, 3-chloroplumbagin, 6-hydroxyplumbagin, plumbaginol แล้วยังพบ flavonoids, benzenoid, quinoid และ carbohydrates (Krishnaswamy and Purushothaman, 1980; Kini et al., 1997) ทำให้ผู้วิจัยทราบว่ารากเจตมูลเพลิงแดงที่นำมาทดลอง มี plumbagin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ naphthoquinones อยู่จริง

วงจรชีวิตของพยาธิ *F. gigantica* หลังจากพยาธิออกจากเปลือกไข่ จะเคลื่อนที่ไขผนังลำไส้ไปยังตับ ซึ่งสมมุติฐานของผู้วิจัยคือ เปรียบเทียบสารทั้งสามชนิดระหว่าง TCZ, PB และ PI ว่าสารชนิดมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของพยาธิไขผนังลำไส้ หลังจาก host ได้รับสารนั้นๆ โดยผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองเลียนแบบการไขของพยาธิในหลอดทดลอง โดยผู้วิจัยประยุกต์ใช้เยื่อเลือกผ่านแบบสังเคราะห์แทนผนังลำไส้ แล้วทดสอบสารและหาค่า % larval migration inhibition (% LMI) ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.001-10 µg/ml พบว่าการเคลื่อนที่ของพยาธิผ่านแผ่นกรองสังเคราะห์ของ TCZ, PB และ PI ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 µg/ml มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง TCZ, PB และ PI พบว่า PB ให้ผลยับยั้งการไขของพยาธิดีที่สุด ทั้งสามเข้มข้น (LMI =100%) ในขณะที่ TCZ ให้ผลรองลงมาและ PI ให้ผลยับยั้งการไขของพยาธิน้อยที่สุด เรียงตามลำดับความเข้มข้น แม้ว่าสาร PI มีผลต่อการยับยั้งการไขของพยาธิผ่านแผ่นสังเคราะห์น้อยกว่า TCZ แต่มีผลยับยั้งการไขผ่านแผ่นสังเคราะห์ของพยาธิใกล้เคียงกับ TCZ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั้นหมายความว่า PB มีประสิทธิภาพในการ



ป้องกันการติดเชื้อพยาธิระยะ NEJs ไม่ให้สามารถเดินทางผ่านผนังลำไส้ไปที่ตับได้ โดย ค่า  $IC_{50}$  ของ TCZ, PB และ PI เท่ากับ 1.04, 0.73 และ 0.88  $\mu\text{g/ml}$  เรียงตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ (Lorsuwanarat et al., 2014) ว่า PB สามารถยับยั้งพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* การไชผ่านแผ่นกรองได้ดีถึง 88-99% LMI ที่ความเข้มข้น 1 และ 10  $\mu\text{g/ml}$  แต่ในการทดลองครั้งนี้ TCZ สามารถยับยั้งการไชของพยาธิผ่านแผ่นสังเคราะห์ได้ดีกว่าการทดลองที่ผ่านมา ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับสารที่ใช้เป็นของส่งมาใหม่ทั้งหมด และอาปรารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับ TCZ, PB และ PI จะใช้ทันทีเมื่อผสมเสร็จ จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ใน TCZ, PB และ PI ยังไม่มีการเสื่อมสลาย ทำให้ประสิทธิภาพค่อนข้างสูง สามารถซึมผ่านตัวพยาธิได้เร็ว จึงทำให้พยาธิ เกิดเป็นอัมพาตไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ ส่งผลให้พยาธิระยะ NEJs ที่ได้รับสารไม่สามารถไชผ่านแผ่นสังเคราะห์ได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองใน *F. gigantica* กับ artemether, artesunate และ tetrahydroxystilbene (Tansitit et al., 2012, Saowakon et al., 2013) จากการสังเกตของผู้วิจัยภายใต้กล้อง stereomicroscope พบว่าพยาธิที่ไชผ่านแผ่นสังเคราะห์ลงไปด้านล่าง มีการเคลื่อนไหวน้อยมากหรือไม่เคลื่อนไหว นอกจากนี้สีผิวของพยาธิแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน กลุ่มพยาธิที่ได้รับ PB ผิวจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนพยาธิกลุ่มที่ได้รับ PI ผิวเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Saowakon และ คณะ (2013) ว่า PB สามารถมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังของพยาธิทางเดินอาหาร *Paramphistomum cervi* ซึ่งสามารถตรวจสอบสมมุติฐานดังกล่าว ได้จากการศึกษาค่าความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหว (RM value) และดัชนีการรอดของพยาธิ (survival index) ในระยะ NEJs

แม้ว่าค่าเฉลี่ยของ relative (RM) value ทั้ง TCZ และ PB มีผลต่อยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ NEJs ได้ดีกว่า PI ในระยะแรกๆของการทดลอง แต่ค่า survival index (SI) ของ PI ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไปสามารถฆ่าพยาธิได้เทียบเท่ากับ TCZ และ PB เมื่อเทียบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน แม้ว่าจะก่อนหน้านี้มีรายงานว่า PB ที่ความเข้มข้น 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  จะส่งผลลด RM value และ SI อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 1 และพยาธิตายทั้งหมดในชั่วโมงที่ 3 ในขณะที่ TCZ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ไม่มีผลกับการฆ่าพยาธิตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (Lorsuwanarat et al., 2014) ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองของผู้วิจัยที่ PB สามารถฆ่าพยาธิได้ที่ชั่วโมงที่ 6 สิ่งที่น่าสนใจคือ PI ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบของ PB ซึ่งมี PB เพียง 3.02 ppm สามารถออกฤทธิ์ฆ่าพยาธิได้เช่นเดียวกับ PB เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  เรียงตามลำดับ นั้นหมายความว่าสารอื่นๆที่พบใน PI มีฤทธิ์เสริมการฆ่าพยาธิ *F. gigantica* ในระยะ NEJs ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จำกัดขอบเขตแค่สารสำคัญใน PI เท่านั้น เมื่อนำพยาธิมาศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงที่ผิวพยาธิโดยกล้อง stereomicroscope และ SEM พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงคล้ายกันคือมีการบวม ตุ่มพอง การแตกของตุ่มพองและการหลุดลอกของผิวพยาธิ เรียงตามลำดับ แต่สิ่งที่แตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับ TCZ และกลุ่มที่ได้รับ PB และ PI คือพยาธิในกลุ่มที่ได้รับ TCZ ตัวจะขาวขุ่น มีตุ่มพอง ไม่เคลื่อนไหว ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PB และ PI มีลักษณะแบนคล้ายใบไม้ มีตุ่มพองสีน้ำตาลติดตามตัว หลังจากศึกษาภายใต้กล้อง SEM ให้ผลเช่นเดียวกับที่เห็นด้วยกล้อง stereomicroscope แต่สามารถเห็นรายละเอียดของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้ทั้งทางด้าน ventral และ dorsal surfaces ส่วนใหญ่พยาธิสภาพของพยาธิที่ได้รับ PB และ PI เกิดที่ด้าน ventral ส่วนหัวตั้งแต่ oral sucker ถึง ventral sucker เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังมีพยาธิสภาพกลางลำตัวและหางเรียงตามลำดับความรุนแรงของการเกิดพยาธิสภาพ ผลการ

ทดลองครั้งนี้การศึกษาคล้ายกับรายงานก่อนหน้านี้ (Lorsuwannarat et al., 2014; Saowakon et al., 2013)

ส่วนผลของ RM value และ SI ของสารทั้งสามชนิดในพยาธิ *F. gigantica* ระยะ 4 สัปดาห์ในหลอดทดลองพบว่าสารที่ส่งผลต่อ RM value และ SI มากที่สุดคือ PB รองลงมาคือ PI และ TCZ เรียงตามลำดับ PB ที่ความเข้มข้น 10 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  สามารถฆ่าพยาธิได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ ส่วน PI ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  จึงจะสามารถฆ่าพยาธิได้ทั้งหมด เมื่อกำหนดหาความเข้มข้นของ PB ที่ยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิ *F. gigantica* ได้ 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) เท่ากับ 2.40  $\mu\text{g/ml}$  ในขณะที่  $\text{IC}_{50}$  ของ PI เท่ากับ 2.77  $\mu\text{g/ml}$  แต่ TCZ ไม่มีความสามารถในการฆ่าพยาธิในระยะ 4 สัปดาห์ จะเห็นว่าทั้ง PB และ PI ใช้ปริมาณใกล้เคียงกันในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิ *F. gigantica* ที่ระยะ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ PI ต้องใช้ปริมาณสารเพิ่มเป็น 1.2 เท่าของ PB เนื่องจาก PI เป็นสารสกัดหยาบซึ่งมีสารประกอบหลายชนิดอยู่ในสารสกัดหยาบ หนึ่งในนั้นคือ PB ซึ่งการศึกษานี้ได้วัดปริมาณของ PB ใน PI ว่ามีประมาณ 3.02 ppm และจากศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าพบ PB ในรากของ *P. zeylanica* มี PB เท่ากับ 1.2 % (Bothiraja et al., 2011) ดังนั้น PI ต้องใช้เพิ่มอย่างน้อยเป็น 10-100 เท่าของ PB จึงจะได้ผลเทียบเคียงกับ PB ดังผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า PI ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลทั้งการเคลื่อนไหวและการรอดของพยาธิ (RM value & SI) ลดลง มีค่าใกล้เคียงกับ PB ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อเทียบผลของ  $\text{IC}_{50}$  ของ PB ในการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ Atjanasuppat และคณะ (2009) รายงานว่าผลของ PB ใน *C. elegans* และ *P. epiclitum* มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 9.71 และ 130  $\mu\text{g/ml}$  เรียงตามลำดับ จะเห็นว่า PB มีผลต่อพยาธิ *F. gigantica* มากกว่า *C. elegans* และ *P. epiclitum* (Atjanasuppat et al., 2009) และมีผลใกล้เคียงกับ *F. gigantica* ( $\text{IC}_{50} = 2.4 \mu\text{g/ml}$ ) (Lorsuwannarat et al., 2014) นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบผลของสารที่ทดสอบทั้งสามชนิดพบว่า PB และ PI ส่งผลต่อค่า SI มากกว่า TCZ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ผลของ PI ยังมีประสิทธิภาพดีกว่าปวดหาคหรือสารสกัดหยาบจากต้นมะหาด (*Artocarpus lakoocha*) ที่ทดสอบพยาธิ *F. gigantica* ในหลอดทดลอง ซึ่งใช้ปริมาณ 250 mg/ml จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่และเกิดพยาธิสภาพบริเวณผิวหนังพยาธิ (Saowakon et al., 2009) ซึ่งหากมีการศึกษาและพัฒนาต่อไป โดยการแยก fraction ของสารประกอบต่างๆที่พบใน PI ด้วยวิธี HPLC แล้วนำมาทดสอบกับพยาธิ จะทำให้ทราบองค์ประกอบต่างๆที่พบใน PI อาจจะมีสารบางชนิดเสริมฤทธิ์ นอกเหนือจาก PB

ช่วงอายุของพยาธิมีผลต่อความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ เห็นได้จากทั้ง TCZ, PB และ PI ออกฤทธิ์ได้ดีกับพยาธิในระยะ NEJs มากกว่าระยะ 4 สัปดาห์ พยาธิระยะ NEJs ยังเจริญไม่เต็มที่ ผิวจะบางกว่าระยะ 4 สัปดาห์ซึ่งเป็นระยะตัวเต็มวัย เมื่อพยาธิโตขึ้น ผิวพยาธิจะหนามากขึ้นและมีการพัฒนาของผิวเรียบร้อยแล้ว ทำให้ป้องกันอันตรายได้ดีกว่าระยะ NEJs ทำให้ต้องใช้สารทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลาในระยะ 4 สัปดาห์นานกว่าระยะ NEJs จึงจะเห็นในการตาย ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Bennet and Kohler, 1987; Duthaler et al., 2010; Lorsuwannarat et al., 2014) คุณสมบัติของการละลายมีผลต่อการซึมผ่านของเยื่อเลือกผ่าน โดยปกติส่วนของ plasma membrane ของเซลล์สัตว์จะประกอบด้วย phospholipid, glycerol และโปรตีนเป็นหลัก สารที่สามารถเข้า-ออกผ่าน plasma membrane ได้โดยง่ายต้องเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กกว่าช่องว่างของ plasma membrane หรือมี

คุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน จะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย ในการทดลองครั้งนี้ สาร PB เป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในแอลกอฮอล์ได้บางส่วน ละลายได้ดีในเฮกเซน ผู้วิจัยจึงใช้ 0.1%–DMSO เป็นตัวทำละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยความเข้มข้นนี้ไม่ส่งผลต่อ plasma membrane ของเซลล์โหนดและต่อการทำงานของเซลล์สัตว์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้ 0.1% DMSO ในการเตรียมสารที่นำมาทดสอบกับพยาธิทุกการทดลอง โดยปกติหากภายในเซลล์เสียภาวะสมดุลของของเหลวระหว่างภายในกับภายนอก จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานภายในเซลล์ ตัวพยาธิก็เช่นกันหากเสียสมดุลของของเหลวระหว่างภายในกับภายนอกตัวพยาธิ อาจจะทำให้พยาธิขยับหรือเคลื่อนไหวน้อยลง จนกระทั่งไม่เคลื่อนไหวและตายในที่สุด ซึ่งตรวจสอบการตายโดยใช้ methylene blue เป็นสีย้อมติดเซลล์ที่ตายแล้ว อีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิคือความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ โดยความเข้มข้นของสารเป็นสัดส่วนผกผันกับการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของพยาธิ (Duthaler et al., 2010; Lorsuwanarat et al., 2014) จากการทดลองนี้พบว่า PB ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml มีประสิทธิภาพฆ่าพยาธิได้ทั้งในระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ PI ต้องเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของ PB จึงจะมีศักยภาพออกฤทธิ์เทียบเท่า PB เนื่องจาก PI เป็นสารสกัดหยาบในการออกฤทธิ์อาจจะต้องใช้เวลาเมื่อเทียบกับสารบริสุทธิ์ ดังนั้นเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง PI สามารถซึมผ่านผิวของพยาธิไปในตัวพยาธิ จึงจะส่งผลต่อการตายของพยาธิ

ผิวของพยาธิเป็นส่วนสำคัญของพยาธิที่ทำหน้าที่ดูดซึมอาหาร กำจัดของเสีย รักษาสมดุลร่างกายและป้องกันอันตรายให้กับพยาธิเพราะผิวพยาธิจะสัมผัส antigen ของโฮสต์ ยาและสิ่งแวดล้อมภายนอก (Halton, 2004) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิหลังจากการศึกษาในหลอดทดลองแล้ว ด้วยกล้อง SEM ใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของผิวพยาธิ ซึ่งกระบวนการเริ่มจากเสียสมดุลร่างกาย ทำให้เกิดการน้ำและสารอื่นเข้าสู่เซลล์ ทำให้ผิวพยาธิบวมเต่ง จนเกิดเป็นตุ่มพองกระจายกินบริเวณกว้าง ทำให้เกิดสูญเสียการรักษาสภาพของโครงสร้างลึกต่อผิวของพยาธิ ทำให้เกิดการระเบิดของตุ่มพองและเป็นแผลเปิด ซึ่งทำให้สูญเสียความสามารถของ cytoskeleton ในการยึดเกาะระหว่างผิวหนึ่งกับโครงสร้างชั้นลึกและสุดท้ายเกิดการหลุดลอกของผิวเป็นบริเวณกว้าง พบว่าทุกกลุ่มที่ได้รับ TCZ, PB และ PI เกิดพยาธิสภาพตั้งแต่ 3 ชั่วโมงหลังการทดลอง ซึ่งในกลุ่มที่ได้รับสาร TCZ เกิดการบวมและตุ่มพองบางแห่ง ตัวพยาธิมีลักษณะบิดงอ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PB และ PI มีการเปลี่ยนแปลงของผิวในลักษณะเดียวกันคือ ตัวพยาธิแบนเหมือนใบไม้และในกลุ่ม PI มีตุ่มพองขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่ได้รับ PB แต่พยาธิสภาพกินพื้นที่กว้างกว่าและพยาธิสภาพส่วนใหญ่อยู่ที่ส่วนหัวและกลางลำตัวด้าน ventral มากกว่าด้าน dorsal ซึ่งอาจจะเนื่องจากด้าน ventral เป็นส่วนที่พบ oral และ ventral suckers ซึ่ง oral sucker พยาธิใช้หาอาหาร ในขณะที่ ventral sucker ใช้เกาะกับผนังของโฮสต์ ทำให้สัมผัสกับสารเป็นส่วนใหญ่ เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Keiser and Morson, 2008; Lorsuwanarate et al., 2013, 2014; Saowakon et al., 2013)

หลังจากการทดลองในหลอดทดลองแล้ว ผู้วิจัยยังสงสัยว่า PI และ PB จะมีศักยภาพใช้เป็นยาป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้หรือสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในสัตว์ทดลองได้หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (negative control) และกลุ่ม positive control (TCZ) พบว่าประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ (% protection) ของสารทดสอบทั้งสามชนิดนี้ที่ความเข้มข้นเดียวกัน TCZ มีประสิทธิภาพสูงกว่า PI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ TCZ จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า PB แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร PB และ PI เป็น 25 และ 100 mg/kg เรียงตามลำดับ PB ให้ผลเกิน 50% protection เทียบเท่าฤทธิ์ของ TCZ ผลของ PI ต่อ % protection จึงมีค่าใกล้เคียงกับ PB ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของสารสกัดหยาบจากต้นมะหาด (*Artocarpus lakoocha*) ต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* (Saowakon et al., 2009) ถึงแม้ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของ PB และ PI ว่าจำเพาะเจาะจงกับส่วนใดนอกเหนือจากส่วนผิวของพยาธิ *F. gigantica* ซึ่งต้องการศึกษาต่อยอดในอนาคตว่า PB และ PI ออกฤทธิ์ต่อวัฏวะเป้าหมายใดของพยาธิและสามารถพัฒนาสกัดสารจากสารสกัดหยาบแต่ละ fraction จากรากเจตมูลเพลิงแดงว่าให้ฤทธิ์เทียบเคียงกับ PB ที่ขายในท้องตลาดหรือไม่ ซึ่งสามารถพัฒนาศักยภาพของสารสกัดหยาบใช้เป็นยาฆ่าและป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ในอนาคต โดยเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชในประเทศไทยและส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาปลูกพืชชนิดนี้ เพื่อลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศและเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร นอกจากนี้ยังเป็นการรักษาและต่อยอดภูมิปัญญาของปราชญ์ชาวบ้าน นอกจากนี้อาจจะนำ PI มาร่วมใช้กับ TCZ ซึ่งอาจจะเสริมฤทธิ์ในการกำจัดพยาธิได้ดีขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นการลดการดื้อยา TCZ หลังจากการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* หรือ *O. viverrini* ซ้ำอีกครั้ง (Saengsawang et al., 2016)

### บทสรุป

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงเทียบกับ plumbagin และ triclabendazole ในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงมีศักยภาพยับยั้งการไชของพยาธิผ่านเยื่อสังเคราะห์ และมีผลต่อการเคลื่อนไหวและการตายของพยาธิ โดยความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงต้องใช้เวลา 10 เท่าของ plumbagin นอกจากนี้เปรียบเทียบสารทั้งสามอย่างต่อการป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้เกิน 50% พบว่าต้องใช้ TCZ ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg ในขณะที่ต้องใช้ plumbagin ที่ความเข้มข้น 25 mg/kg และสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงที่ 100 mg/kg

### ข้อเสนอแนะในการประยุกต์ใช้

1. สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดง มีฤทธิ์ต้านพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ทั้งในระยะ NEJs และระยะ 4 สัปดาห์ ดังนั้นควรนำสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงประยุกต์ใช้กับพยาธิตัวแบนชนิดอื่นที่ติดเชื้อได้ง่าย
2. ในการพัฒนาสารสกัดเพื่อเป็นต้นแบบของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ สามารถเพิ่ม ประสิทธิภาพได้โดยทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้นในอีกระดับหนึ่ง โดยประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านพยาธิทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ยังคงอยู่

### ประโยชน์ที่ได้รับ

1. นำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับนำพืชสมุนไพร มาเป็นยารักษาโรคติดต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*
2. สำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษา ค้นคว้าและพัฒนางานวิจัยในครั้งต่อไปความรู้พื้นฐานและงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติเหล่านี้สามารถเป็นฐานข้อมูล ซึ่งหน่วยงานของภาครัฐและภาคเอกชนสามารถนำไปศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อนำไปสู่การพัฒนาสมุนไพร ใช้เป็นยา

รักษาในสัตว์เท้าก็บในภาคเกษตรกรรม และส่งเสริมเกษตรกรเพาะปลูกต้นเจตมูลเพลิงแดง เพื่อลดการใช้ยานำเข้าจากต่างประเทศ

3. งานวิจัยครั้งนี้สามารถเป็นแหล่งทุนและแหล่งความรู้เพื่อผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทหรือปริญญาเอกได้อย่างน้อย 1-2 คน
4. การเผยแพร่
  - นำผลการวิจัยไปเผยแพร่ในงานประชุมนานาชาติ The 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA 2019) ในระหว่างวันที่ 1-5 กันยายน 2562 ณ อินบรุค ประเทศออสเตรเลีย
  - ถ่ายทอดความรู้สู่ชุมชนให้กับนักเรียนประถม โรงเรียนบ้านหนองเสาเดียว จ.นครราชสีมา วันที่ 25 สิงหาคม 2562





## บรรณานุกรม

- บอย บุญเอื้อ, วิษณุวัฒน์ ฉิมน้อย, วีระชัย วีโรจน์แสงอรุณ, ทศนีย์ มุงเมือง, สถาพร จิตตपालพงศ์ และบุรินทร์ นิ่มสุพรรณ. (2556). ความชุกของการติดพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola gigantica* ในโคและกระบือ รอบทะเลสาบสงขลาโดยการตรวจด้วยวิธี ELISA โดยใช้ Excretory-Secretory แอนติเจน. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มช. 23:98-109
- Atjanasuppat, K., Wongkham, W., Meepowpan, P., Kittakoo, P., Sobhon, P., Bartlett, A., Whitfield, P.J., (2009). In vitro screening for anthelmintic and antitumour activity of ethnomedicinal plants from Thailand. J. Ethnopharmacol. 123, 475–482.
- Bennett, J.L., Kohler, P., (1987) *Fasciola hepatica*: action in vitro of triclabendazole on immature and adult Stages. Exp. Parasitol. 63, 49–57.
- Duthaler U, Smith TA, and Keiser J. (2010) In vivo and in vitro sensitivity of *Fasciola hepatica* to triclabendazole combined with artesunate, artemether, or OZ78. Antimicrob Agents Chemother., 54, 4596-604.
- Fetterer RH and Fleming MW. (1991) Effects of plumbagin on development of the parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum*. Comp Biochem Physiol C.100, 539-542.
- Halton, D.W., (2004). Review: microscopy and the helminth parasite. Micron 35, 361–390.
- Keiser J, Morson G (2008) *Fasciola hepatica*: tegumental alterations in adult flukes following in vitro and in vivo administration of artesunate and artemether. Exp Parasitol. 2008 Feb;118(2):228-37. doi: 10.1016/j.exppara.2007.08.007. Epub 2007 Aug 22. PMID: 17888906.
- Kini DP, Pandey S, Shenoy BD, Singh UV, Udupa N, Umadevi P, Kamath R, Nagarajkumari, Ramanarayan K. (1997) Antitumor and antifertility activities of plumbagin controlled release formulations. Indian J Exp Biol. 35(4):374-9.
- Krishnaswamy M, Purushothaman KK. (1980) Plumbagin: A study of its anticancer, antibacterial & antifungal properties. Indian J Exp Biol. 18(8):876-7.
- Kueakhai P, Meemon K, Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Riengrojpitak S, and Sobhon P. (2011) Characterization and localization of saposin-like protein-2 (SAP-2) in *Fasciola gigantica*. Parasitol Res. 108, 1493-500.
- Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Jaikua W, Itagaki T, and Sobhon P. (2015) Vaccine potential of recombinant pro- and mature cathepsinL1 against *Fasciolosis gigantica* in mice. Acta Trop. 150, 71-78.
- Lorsuwannarat N, Piedrafita D, Chantree P, Sansri V, Songkoomkrong S, Bantuchai S, Sangpairot K, Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Chansela P, and Sobhon P. (2014) The

- in vitro anthelmintic effects of plumbagin on newly excysted and 4-weeks-old juvenile parasites of *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol.* 136: 5-13.
- Lorsuwannarat N, Saowakon N, Ramasoota P, Wanichanon C, and Sobhon P. (2013) The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.* 133, 18-27.
- Moll L, Gaasenbeek CPH, Vellema P, and Borgsteede FHM. (2000) Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 91, 153–158.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. (2019) Fascioliasis. *Adv Exp Med Biol.* 1154, 71-103.
- Mathew N, Paily KP, Abidha, Vanamail P, Kalyanasundaram M, and Balaraman K. (2002) Macrofilaricidal activity of the plant *Plumbago indica/rosea* in vitro. *Drug Dev Res.* 56, 33-39.
- Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, Borgsteede FH.(2000) Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The netherlands. *Vet Parasitol.* 91(1-2):153-8.
- Mungube EO, Bauni SM, Tenhagen BA, Wamae LW, Nginyi JM, and Mugambi JM. (2006) The prevalence and economic significance of *Fasciola gigantica* and *Stilesia hepatica* in slaughtered animals in the semi-arid coastal Kenya. *Trop Anim Health Prod.* 38, 475-83.
- Nayak, P., Sharma, M., Behera, S.N., Thirunavoukkarasu, M., and Chand, P.K., 2015. High-performance liquid chromatographic quantification of *Plumbago zeylantica* L.:Inter-clonal variation in biomass growth and plumbagin production. *Appl Biochem Biotechnol.* 175, 1745-1770. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1392-2>.
- Overend DJ and Bowen FL. (1995) Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust. Vet. J.*, 72, 275.
- Paiva, S. R., Figueiredo, M.R., Tânia Verônica Aragão, T.V., and Kaplan M.A.C. (2003). Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98 (7), 959-961.
- Padhye, S., Dandawate, P., Yusufi, M., Ahmad, A., and Sarkar, F.H., (2010). Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. *Med Res Rev.* 32 (6), 1131-1158.
- Ribeiro KA, de Carvalho CM, Molina MT, Lima EP, López-Montero E, Reys JR, de Oliveira MB, Pinto AV, Santana AE, and Goulart MO. (2009) Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 111: 44–50.
- Saengsawang P, Promthet S, Bradshaw P. (2016) Reinfection by *Opisthorchis Viverrini* after Treatment with Praziquantel. *Asian Pac J Cancer Prev.* 17(2):857-62.



- Sansri V, Meemon K, Changklungmoa N, Kueakhai P, Chantree P, Chaichanasak P, Lorsuwannarat N, Itagaki T, and Sobhon P. (2015) Protection against *Fasciola gigantica* infection in mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L. Vaccine. 33, 1596-1601.
- Saowakon N, Lorsuwannarat N, Changklungmoa N, Wanichanon C, and Sobhon P. (2013) *Paramphistomum cervi*: the in vitro effect of plumbagin on motility, survival and tegument structure. Exp Parasitol. 133, 179-186.
- Sethadavit M, Meemon K, Jardim A, Spithill TW, and Sobhon P. (2009) Identification, expression and immunolocalization of cathepsin B3, a stage-specific antigen expressed by juvenile *Fasciola gigantica*. Acta Trop. 112, 164-173.
- Shareef PA, Brennan GP, McVeigh P, Khan MA, Morphew RM, Mousley A, Marks NJ, Saifullah MK, Brophy PM, Maule AG, Abidi SM (2014). Time-dependent tegumental surface changes in juvenile *Fasciola gigantica* in response to triclabendazole treatment in goat. Acta Trop. 136, 108-117
- Solomon FE, Sharada AC, and Devi PU. (1993) Toxic effects of crude root extract of *Plumbago rosea* (*Rakta chitraka*) on mice and rats. J Ethnopharmacol. 38, 79-84.
- Srinivasan L, Mathew N, and Muthuswamy K. (2009) In vitro antifilarial activity of glutathione S-transferase inhibitors. Parasitol Res. 105, 1179-182.
- Tansatit, T., Sahaphong, S., Riengrojpitak, S., Viyanant, V., Sobhon, P. (2012) *Fasciola gigantica*: the in vitro effects of artesunate as compared to triclabendazole on the 3-weeks-old juvenile. Exp. Parasitol. 131, 8-19.
- Webb CM, Cabada MM. (2018) Recent developments in the epidemiology, diagnosis, and treatment of *Fasciola* infection. Curr Opin Infect Dis 2018;31:409-14.
- World Health Organization Headquarters, Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. 2006. ISBN 978-92-4-1564090. Switzerland, Geneva.
- World Health Organization. Fascioliasis diagnosis, treatment and control strategy. [https://www.who.int/foodborne\\_trematode\\_infections/fascioliasis/fascioliasis\\_diagnosis/e](https://www.who.int/foodborne_trematode_infections/fascioliasis/fascioliasis_diagnosis/e)
- [www.ข้อมูลสมุนไพร.com](http://www.ข้อมูลสมุนไพร.com)
- [www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html](http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html)
- [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)
- [www.farmanimalhealth.co.uk](http://www.farmanimalhealth.co.uk)
- [www.herbal.pharmacy.psu.ac.th/data/herbal/Plumbago\\_rosea.html](http://www.herbal.pharmacy.psu.ac.th/data/herbal/Plumbago_rosea.html)

ภาคผนวก



ตารางที่ 1 ค่าร้อยละความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (Relative motility, RM) values) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบยา TCZ, PB และ PI ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ระยะ	กลุ่ม	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	ระยะเวลา (ชั่วโมง)					
			0	1	3	6	12	24
NEJs	ควบคุม	0	100	100	100	100	100	100
	TCZ	100	100	10	0	0	0	0
	PB	1	100	100	85	0	0	0
		10	100	87	82	0	0	0
		100	100	54	22	0	0	0
	PI	1	100	100	86	70	39	14
		10	100	77	69	50	13	0
		100	100	71	67	0	0	0
	4-week	ควบคุม	0	100	100	100	100	100
TCZ		100	100	100	100	100	100	98
PB		1	100	100	100	98	64	48
		10	100	100	50	32	10	0
		100	100	60	10	0	0	0
PI		1	100	100	100	100	98	98
		10	100	100	100	100	91	91
		100	100	50	31	29	14	0

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละดัชนีการรอดชีวิต (Survival index, SI) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในระยะ NEJs และ 4 สัปดาห์ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบยา TCZ, PB และ PI ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ระยะ	กลุ่ม	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	ระยะเวลา (ชั่วโมง)						
			0	1	3	6	12	24	
NEJs	ควบคุม	0	100	100	100	100	100	100	
		TCZ	100	100	100	0	0	0	
		PB	1	100	100	85	0	0	
	PI	10	100	87	73	0	0		
		100	100	54	33	0	0		
		1	100	100	86	50	39	14	
	4-week	ควบคุม	10	100	77	69	50	13	0
			100	100	71	67	0	0	
			1	100	100	100	100	100	100
4-week	TCZ	100	100	100	100	100	100		
		PB	1	100	100	100	100	100	
		10	100	100	100	50	30	0	
	PI	100	100	100	30	0	0		
		1	100	100	100	100	100	100	
		10	100	100	100	100	100		
4-week	ควบคุม	100	100	95	93	88	43	0	

## กิจกรรมให้ความรู้สู่ชุมชน

ให้ความรู้เกี่ยวกับพยาธิใบไม้ตับกับนักเรียนประถม รร.บ้านหนองเสาเดียว จ.นครราชสีมา

ณ วันที่ 25 สิงหาคม 2562





## IN VITRO STUDY OF THE PLUMBAGO INDICA ROOT EXTRACT ON FASCIOLA GIGANTICA



Naruwan Saowakon<sup>1</sup>, Yanwarut Camchuen<sup>1</sup>, Narin Changklungmoa<sup>2</sup>,  
Pornanan Kueakhai<sup>2</sup>, Presert Sobhon<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>2</sup> Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Mueang, Chonburi, 20131, Thailand

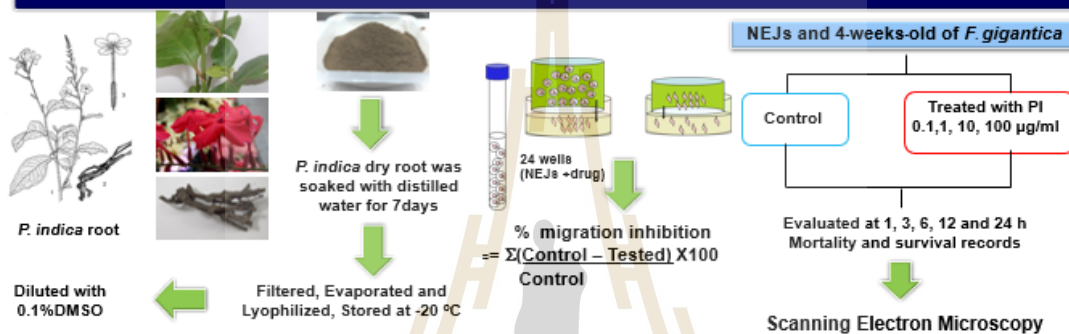
Document ID: P-V-16



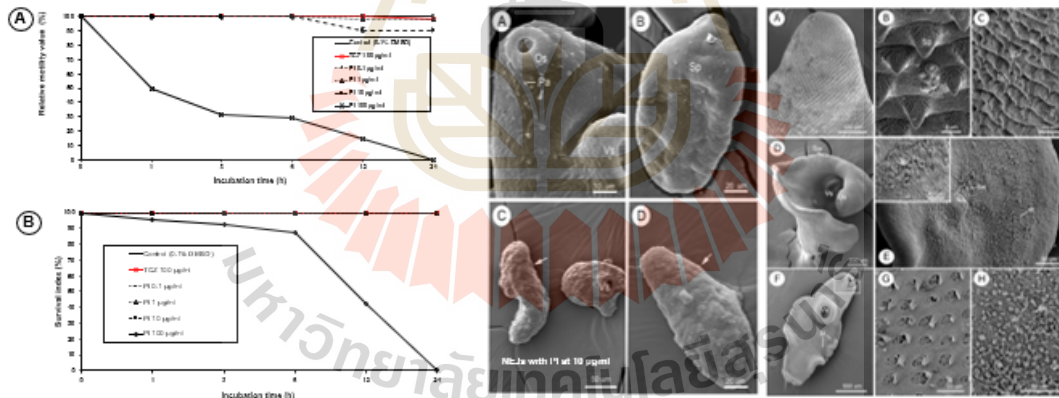
### INTRODUCTION

Liver fluke is a major cause of trematode infection that can be associated with the induction of epithelial bile duct cancer, cholangiocarcinoma. In the previous studies, plumbagin has shown the anthelmintic activities against trematodes, cestodes, and nematodes in *in vitro* and *in vivo* studies (Fetterer and Fleming, 1991, Mathew et al, 2002, Atjanasuppat et al, 2009; Likhitwitayawuid et al, 2005; Lorsuwanarat et al, 2013; Saowakon et al, 2013; Lorsuwanarat et al, 2014). In this work, we have investigated the anthelmintic effects of ethanol root extract of *P. indica* on motility, survival, and tegument surface of newly excysted juveniles (NEJs) and 4-weeks of *F. gigantica* *in vitro* by using relative motility, survival indices and the percentage of larval migration inhibition (%LMI) assays and observation by scanning electron microscopy

### MATERIALS AND METHODS

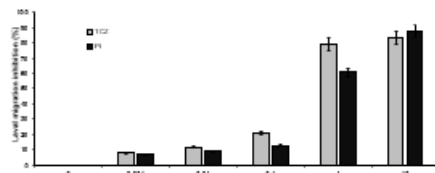


### RESULTS AND DISCUSSION



**Figure 1 (A)** Relative motility (RM) values and **(B)** Survival indices (SI) of 4 weeks old *F. gigantica* treated with triclabendazole (TCZ) and crude extract of *Plumbago indica* root (PI) at various concentrations and times.

**Figure 3-4** Scanning electron micrograph (SEM) of the tegumental surfaces of NEJs and 4 weeks-old *F. gigantica* from untreated control group (A-B), triclabendazole (TCZ) (D and E) and PI treated flukes at 10 µg/ml (F-H).



**Figure 2** The percentage of larval migration inhibition (%LMI) of newly excysted juveniles (NEJs) of *F. gigantica* incubated in various concentrations of TCZ and crude extract of PI root. Each column of the histogram represents 50 NEJs. The experiment is triplicated.

#### Conclusion :

In conclusion, the results obtained in this study clearly indicated that the ethanol extract of *Plumbago indica* root (PI) possesses the anthelmintic activity against *F. gigantica*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Thailand Research Fund, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand (NS).



## 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 ในด้านงานวิชาการและการวิจัยของ ผศ.ดร.นภวรรณ ทำงานเกี่ยวกับการศึกษาสมุนไพรมีฤทธิ์ด้านการติดเชื้อมาใช้ไปไม้ตับในสัตว์และในคน นอกจากนี้ผู้วิจัยมีความสนใจด้านวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับทางด้านเกษตรกรรม ซึ่งสังเกตเห็นปัญหาทางการเกษตรที่สำคัญคือ ปัญหาจากการใช้สารเคมีหรือยาฆ่าพยาธิเกินความจำเป็น จนเกิดการื้อยาในสัตว์ ดังนั้นการใช้พืชทดแทนการใช้ยาฆ่าพยาธิ เพื่อลดการปนเปื้อนยาฆ่าพยาธิในเนื้อสัตว์และในผลิตภัณฑ์สัตว์ เช่นนม และเป็นการต่อยอดองค์ความรู้ทางพิษศาสตร์และวิทยาศาสตร์ โดยนำความรู้จากที่ประยุกต์ใช้ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการนำไปใช้ในสัตว์ที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจต่อไปในอนาคต ปัจจุบันกำลังเขียนผลการทดลองดังกล่าวส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ