



รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของสารสกัดพลัมบาจินจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิตัว
กลม *Haemachus placei* และพยาธิใบไม้กระเพาะ *Paramphistomum*
cervi

In vitro study of anthelmintic effects of purified plumbagin of
Plumbago indica root on *Haemachus placei* and
Paramphistomum cervi

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของสารสกัดพลัมบาจินจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิตัว
กลม *Haemachus placei* และพยาธิใบไม้กระเพาะ *Paramphistomum*
cervi

In vitro study of anthelmintic effects of purified plumbagin of
Plumbago indica root on *Haemachus placei* and
Paramphistomum cervi

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ นฤวรรณ เสาวคนธ์

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2556

กิจกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ โศภน ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์และให้ยืมสารเคมีเบื้องต้น ในการทำวิจัยและเสนอแนะเกี่ยวข้องกับการทำวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และนักศึกษาปริญญาเอกที่ทำวิจัยพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างพยาธิทั้งสองชนิด จากโรงฆ่าสัตว์ จังหวัดปทุมธานีและจังหวัดสระบุรี นอกจากนี้การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนการทำวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2554

อาจารย์ ดร. นภวรรณ เสาวคนธ์

มีนาคม 2556

ข

บทคัดย่อภาษาไทย

ปัจจุบันยาฆ่าพยาธิในท้องตลาดไม่สามารถฆ่าพยาธิใบไม้กระเพาะ และพยาธิตัวกลมได้ การค้นหายาฆ่าพยาธิจึงเป็นเรื่องเร่งด่วน มีรายงานว่าสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin สามารถยับยั้งการเคลื่อนไหวของ *Caenorhabditis elegans* และพยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma mansoni* ระยะ cercariae วัตถุประสงค์การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิ *Haemaphysalis placei* และพยาธิใบไม้กระเพาะ *Paramphistomum cervi* โดยประเมินค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (relative motility; RM value) ที่เปลี่ยนแปลง และการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้พยาธิชนิดละ 240 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 10 ตัว คือ กลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 พยาธิถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-199 ผสมด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0, และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ กลุ่มที่ 5 พยาธิถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยยา albendazole (ABZ) เป็นกลุ่ม positive control และกลุ่มที่ 6 พยาธิเลี้ยง 0.1% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม พยาธิถูกประเมินการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวที่ชั่วโมงที่ 3, 6, 12 และ 24 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo-microscope หลังจากนั้นพยาธิถูกนำไปผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผิวโดยย้อมสี H&E ผลการทดลองพบว่าพยาธิทั้งสองชนิดที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า RM values ลดลงต่ำกว่ากลุ่มพยาธิที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมด้วย ABZ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ถึงชั่วโมงที่ 12 และชั่วโมงที่ 24 มีเคลื่อนไหวของพยาธิ *P. cervi* ในสารสกัด plumbagin น้อยมาก เมื่อประเมินการเคลื่อนไหวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo-microscope พบว่าผิวของพยาธิ *P. cervi* เกิดตุ่มพองและมีการหลุดลอกของผิวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และลักษณะผิวเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงผ่านพบว่าผิวพยาธิ *P. cervi* เกิดตุ่มพอง ผิวพยาธิถูกการกัดกร่อนและเกิดการหลุดลอกของผิวของพยาธิตามลำดับ ส่วนพยาธิ *H. placei* หลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีการเคลื่อนไหวลดลงที่ชั่วโมงที่ 3 และ 6 หลังจากนั้นไม่มีการเคลื่อนไหวของพยาธิตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 จึงตรวจสอบการตายของพยาธิโดยใช้การติดสี methylene blue (vital dye) พบว่าติดสีน้ำเงินเข้ม เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo-microscope พบว่าผิวของพยาธิ *H. placei* บวมแต่ไม่มีการหลุดลอกของผิว และพยาธิในกลุ่มที่ทดสอบสารสกัด plumbagin ความเข้มข้น 0.1 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิ *H. placei* เคลื่อนที่ช้าลงที่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงผ่านพบว่าผิวพยาธิ *H. placei* ไม่เปลี่ยนแปลง แต่โครงสร้างส่วน parenchymal cells และ vitelline cells เกิด apoptosis จากผลการทดลองเสนอว่า สารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงสามารถยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิ *P. cervi* และ *H. placei* ในระยะตัวเต็มวัย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Presently, the commercial anthelmintic drug can inhibit paramphistomum spp. and nematode infection. The drug discovery is urgent. Reportedly, the anthelmintic effect of purified plumbagin of *P. indica* inhibited the motility of *Caenorhabditis elegans* and infective cercariae stage of *Schistosoma mansoni*. Therefore, this work aimed to investigate the anthelmintic effect of purified plumbagin (PB) of *P. indica* root on adult *Paramphistomum cervi* and *Haemonchus placei* on relative motility (RM) assay and histopathological changes. Two hundred and forty flukes in each specie were divided in to 6 treatment groups (n=10 per group). Groups 1, 2, 3, and 4 flukes were incubated with M-199 medium containing plumbagin in the serial concentrations; 0.01, 0.1, 1.0, and 10 µg/ml, respectively. Group 5, as incubated with medium mixed with albendazole (ABZ) at 10 µg/ml as the positive control and group 6, and they were incubated with medium containing 0.1% DMSO as the negative control. Flukes were evaluated the RM values on 3, 6, 12 and 24 h incubation using scoring under the stereo-microscopy. Then, they were collected from each observation time to run tissue processing for histopathological changes using H&E staining. The results showed that RM values of PB-treated groups at the concentration 10 µg/ml in *P.cervi* and *H.placei* were progressively decreased more than ABZ-treated group since 3 to 12 h exposure, and few activity of *P. cervi* was observed at 24 h exposure. Observation under the stereo-microscope, adult *P.cervi* appeared numerous blebs and peeling of tegument after 12 h exposure. Moreover, the tegumental surface of *P.cervi* became the dark brown to black color at the end of experiment. Light microscopic observation showed the numerous blebs, erosion and desquamation of tegument of *P.cervi*. *H.placei* were partial move on 3 h and 6 h incubation in PB at concentration 10 µg/ml. At 12 h and 24 h exposure, they were dead which were confirmed by vital dye staining. The swelling tegumental surface of *H.placei* was occurred, but their tegument did not peel off. The slowly motility of *H.placei* was observed after 12 h and 24 h incubation with plumbagin at 0.1 and 1 µg/ml. Light microscopic observation showed similar tegumental layer as normal group of *H.placei*. But, the parenchymal cells and vitelline cells in deeper of parasites-treated plumbagin were found apoptotic appearance. These results suggest that plumbagin of *P. indica* could be against the motility of adult stage of *P.cervi* and *H.placei*.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ข้อตกลงเบื้องต้น	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล.....	4
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	4
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	5
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผลการทดลอง.....	7
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	21
ข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	23
ประวัติผู้วิจัย	26

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1	การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin ต่อพยาธิตัวกลม <i>H. placei</i> และ พยาธิใบไม้กระเพาะ <i>P. cervi</i> ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ กัน	4
ตารางที่ 2	แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะ <i>P.cervi</i> เทียบกับกลุ่มควบคุม หลังได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	9
ตารางที่ 3	แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลม <i>H.placei</i> เทียบกับกลุ่มควบคุม หลังได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	15

ฉ
สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงการประเมินการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะ <i>P.cervi</i> ที่ไม่มีการเคลื่อนไหวด้วย methylene blue (vital dye).....	5
ภาพที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว relative motility (RM) values ของพยาธิใบไม้กระเพาะ <i>Paramphistomum cervi</i> ที่ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12 และ 24 หลังได้รับ albendazole (ABZ) หรือ สารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	9
ภาพที่ 3 แสดงพยาธิใบไม้กระเพาะ <i>Paramphistomum cervi</i> ที่พบในกระเพาะวัว (A) และเมื่อนำมาล้างด้วย 0.85% NaCl (B) พยาธิถูกนำมาทดสอบสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	10
ภาพที่ 4 แสดงจุลพยาธิพื้นฐานของพยาธิใบไม้กระเพาะ <i>Paramphistomum cervi</i> ที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆเทียบกับควบคุม	12
ภาพที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว relative motility (RM) values ของพยาธิตัวกลม <i>Haemonchus placei</i> ที่ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12 และ 24 หลังได้รับ albendazole (ABZ) หรือ สารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	15
ภาพที่ 6 แสดงจุลพยาธิพื้นฐานของพยาธิตัวกลม <i>H.placei</i> ที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆเทียบกับควบคุม	17