

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การติดพยาธิภายในพบได้บ่อยจนถือเป็นโรคประจำถิ่นของวัว-ควายในประเทศไทย เนื่องจากส่วนใหญ่เกษตรกรมักจะนำสัตว์เลี้ยงปล่อยทุ่งหากินหญ้าและอาหารเอง ดังนั้นจึงมักจะได้รับไข่พยาธิจากแหล่งน้ำหรือจากพาหะกลาง เช่น หอย หรือ ปลา เป็นต้น พยาธิที่สำคัญเช่น พยาธิใบไม้ตับ (*Fasciola gigantica*) พยาธิตัวกลมในทางเดินอาหาร (gastrointestinal, GI-nematode) พยาธิเส้นด้าย (*Stroglyoides* spp.) และพยาธิใบไม้กระเพาะ (Paramphistomum spp.) เป็นต้น ซึ่งพยาธิเหล่านี้มีการระบาดมากในโคกระบือในประเทศไทย ทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพสัตว์และผลผลิตสัตว์เป็นอย่างมาก (Hoerchner et al., 1989; Pholpark and Srijitjakarn, 1989) สัตว์บางตัวอาจป่วยโดยแสดงอาการหรือไม่แสดงอาการก็ได้ (Blezinger, 1998) สัตว์ที่ไม่แสดงอาการป่วยจะเป็นตัวอมโรคและสามารถแพร่กระจายโรคไปสู่โคและสัตว์อื่นบางชนิด ในรายที่แสดงอาการรุนแรงอาจทำให้สัตว์ตาย อาการและความรุนแรงของโรคจะขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณของปรสิต และอายุของสัตว์ โดยสัตว์ที่มีอายุมากจะมีความต้านทานต่อโรคพยาธิได้ดีกว่า (Morter, 2006; Stickland, 2003) นอกจากนี้การระบาดของโรคพยาธิบางชนิดจะมีความสัมพันธ์กับฤดูกาลและพื้นที่ที่มีแหล่งน้ำขัง (Bagley, 1997 ;Tyler, 2000)

พยาธิใบไม้ (trematode) เป็นปรสิตที่มีวงจรชีวิตซับซ้อน มีระยะวัยอ่อนใน intermediate host และระยะตัวเต็มวัยใน definitive host แหล่งที่อยู่อาศัยของพยาธิแตกต่างกัน รวมถึงขนาด รูปร่างที่แตกต่างกันด้วย พยาธิใบไม้กระเพาะ Paramphistomum spp. เป็นพยาธิหลักที่พบในแกะ แพะ โคและกระบือ (Hanna et al., 1988; Boray, 1959) ซึ่งทำให้เกิดโรค Paramphistomosis ในประเทศไทยพบได้ทั่วไป (อุษาและคณะ, 2528; ประกิจและยรรยง, 2548; Prasittirat et al., 1996) อัตราการติดพยาธิของโคเนื้อสูงกว่าโคนมอย่างมาก โดยระหว่างปี 2535-2538 พบไข่พยาธิในโคเนื้อและโคนม อยู่ช่วง 63-80% และ 14.0-35.8% ตามลำดับ (Prasittirat et al., 1996) และจากการสำรวจในปี 2547 บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง พบไข่พยาธิในกระบือสูงกว่าโคเนื้อเป็น 46% และ 37% ตามลำดับ (ประเสริฐและคณะ, 2550) ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนเช่น จังหวัดกาฬสินธุ์ มีการสำรวจพยาธิในโคเต็มวัยพบว่าพยาธิใบไม้ในกระเพาะถึง 34% รองจากพยาธิกลุ่ม strongylids (สุรสิทธิ์และพิทยา, 2548) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดพยาธิของลูกกระบือและกระบือในวัยเจริญพันธุ์ พบไข่พยาธิ Paramphistomum spp. 87% และ 45% ตามลำดับ (ดรุณีและนพดล, 2528; ประเสริฐและคณะ, 2550) ส่วนพยาธิพยาธิตัวกลมในทางเดินอาหาร มักแย่งอาหาร รบกวนการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ทำให้สัตว์เบื่ออาหาร น้ำหนักลด แคระแกรน ให้ผลผลิตลดลง ความต้านทานลดลง และในรายที่รุนแรงอาจทำให้สัตว์ตายได้ (วิจิตร, 2532) จากการศึกษาของมานวิภาและสมใจ (2537) พบว่าพยาธิตัวกลมในกระเพาะและลำไส้ร่วมกับการขาดอาหารเป็นสาเหตุสำคัญของความไม่สมบูรณ์พันธุ์ของโคนม ประเสริฐและคณะ (2550) รายงานว่าโคเนื้อติดพยาธิ GI-nematode ถึง 36% รองจากพยาธิ Paramphistomum spp. ทุกจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างโดยเฉพาะ นครราชสีมา สุรินทร์ บุรีรัมย์ ยโสธร และอำนาจเจริญ

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าทั้งพยาธิ *Paramphistomum* spp. และ GI-nematode สามารถพบได้ทั้งในกระปือและโค ซึ่งในอดีตไม่มีรายงานว่าพยาธิ *Paramphistomum* spp. และ GI-nematode ก่อให้เกิดอันตรายรุนแรงแก่สุขภาพสัตว์ แต่ Richey และ Courtney, (2002) พบว่าพยาธิ *Paramphistomum* spp. ทำให้โคมีอาการป่วยและก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจโดยมักพบร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ แม้ว่าพยาธิ *Paramphistomum* spp. และ GI-nematode จะไม่มีความสำคัญในการก่อโรคมานักแต่ก็มีผลต่อการแย่งอาหาร ทำให้สุขภาพสัตว์ทรุดโทรมได้ และยาถ่ายพยาธิที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในพื้นที่โดยเฉพาะส่วนราชการคือ albendazole และ triclabendazole ซึ่งออกฤทธิ์กว้างครอบคลุมทั้งพยาธิ GI-nematode และ *Fasciola gigantica* (Turner et al., 1984; Sukhapesna et al., 1992; Stitt and Fairweather, 1993; Foreyt, 1996) แต่กลับพบว่าพยาธิ *Paramphistomum* spp. และ GI-nematode กลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทั้งในโคเนื้อและกระปือ แสดงว่าอาจจะมีการดื้อยาเกิดขึ้น(สุกัญญาและคณะ, 2545 ; ประเสริฐและคณะ, 2550) ส่วนพยาธิ *Fasciola gigantica* พบเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ (ประเสริฐและคณะ, 2550; บุญจันทร์และสุชาติ, 2551)

ข้อเสียจากการใช้ยาฆ่าพยาธิคือ ต้องให้ยาสดอย่างสม่ำเสมอ จึงทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงและอาจมีการดื้อยาตามมา ดังนั้นการมองหาทางเลือกในการใช้ยากำจัดพยาธิที่มาจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเช่นสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความรู้ในการศึกษา ในการทดลองที่นำเสนอนี้เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดปลัมบาจिनจากรากเจตมูลเพลิงแดงกับผลของ albendazole ที่มีต่อพยาธิตัวกลมในทางเดินอาหาร *Haemonchus placei* และ พยาธิใบไม้กระเพาะ *Paramphistomum cervi*

ปลัมบาจिन (plumbagin) เป็นสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago rosea*, Linn.) ซึ่งมีรายงานว่าให้ผลต่อการฟักตัวของพยาธิตัวกลม *Haemonchus contortus* และ *Ascaris suum* (Fetterer and Fleming, 1991) และมีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลม *Caenorhabditis elegans* และตัวแบน *Schistosoma mansoni* (Atjanasuppat et al., 2009) ดังนั้น plumbagin น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยากำจัดพยาธิ *Paramphistomum* spp. และ *Haemonchus placei* ในโคได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ในการฆ่าพยาธิตัวกลม *H. placei* และพยาธิใบไม้กระเพาะ *P. cervi* ระหว่าง albendazole และสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดง
- 1.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของ tegumental surface ของพยาธิตัวกลม *H. placei* และพยาธิใบไม้กระเพาะ *P. cervi* ที่เกิดจาก albendazole และสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาผลของยาฆ่าพยาธิ albendazole และสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดง ในการฆ่าพยาธิตัวกลม *H. placei* และ พยาธิใบไม้กระเพาะ *P. cervi* และศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ผิวของพยาธิทั้งสองชนิดอันเป็นผลของ albendazole และ plumbagin ด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological technique) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เพื่อเป็นข้อมูล

พื้นฐานทางด้านการวิจัยที่จะได้นำไปใช้ในงานวิจัยอื่นๆต่อไป
ประยุกต์ใช้ในการศึกษาในสัตว์ทดลอง ต่อไป

อีกทั้งข้อมูลดังกล่าวจะได้นำไปใช้

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำ
ผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

- ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin สามารถฆ่าพยาธิฆ่าพยาธิตัวกลม *H. placei* และ พยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* ได้หรือไม่ เพื่อไปต่อยอดในการขอทุนวิจัย ภายนอก
- ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนผิวพยาธิ (Tegumental surface) อันเป็นผลจากการสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin
- ผลของสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin การทดลองในหลอดทดลองจะเป็นข้อมูลเบื้องต้น ใน การศึกษาเกี่ยวกับการฟักไข่ของพยาธิและการทดลองในสัตว์ทดลองที่ได้รับพยาธิทั้งสองชนิดนี้ต่อไป

2. นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

- เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการศึกษาพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพร เพื่อลองใช้เป็นยาฆ่าพยาธิใน สัตว์ทำกบ เช่น วัว และแพะ เป็นต้น
- เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย เช่น กรมปศุสัตว์ ได้เผยแพร่ความรู้สู่เกษตรกร

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

1. ผลการทดลองสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการขอทุนภายนอก เช่น ทุนสกว. เป็นต้น

2. นำไปเสนอในการประชุมระดับชาติ

- นำเสนอผลงานระดับชาติ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ตัวยากำจัดพยาธิและสารสกัดจากสมุนไพร

ยากำจัดพยาธิ albendazole (ABZ) ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมปศุสัตว์ สารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin ได้จัดซื้อจากบริษัท S.M Chemical จำกัด

เก็บตัวอย่างพยาธิ

พยาธิทั้งสองชนิดเก็บจากโรงฆ่าวัวที่จังหวัดปทุมธานีและนครราชสีมา โดยพยาธิที่เก็บจะเลือกเฉพาะที่มาจากวัวทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนใต้เท่านั้น

การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิจัย

เตรียมยากำจัดพยาธิ albendazole ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml และ สารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดง ที่ความเข้มข้นต่างๆกันที่ 10, 1, 0.1 และ 0.01 µg/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-199 ที่ผสมยาปฏิชีวนะ (penicillin 50 IU/ml, streptomycin 50 µg/ml, gentamycin 30 IU/ml) พยาธิที่นำมาทดสอบผลการฆ่าพยาธิตัวกลม *H. placei* และ พยาธิใบไม้กระเพาะ *P. cervi* ต้องเป็นพยาธิที่สมบูรณ์และยังเคลื่อนไหว ใช้พยาธิชนิดละ 240 ตัวต่อครั้ง ทำ 3 ซ้ำ แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง กลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 พยาธิถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-199 ผสมด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0, และ 10 µg/ml ตามลำดับ กลุ่มที่ 5 พยาธิถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วย albendazole (ABZ) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นกลุ่ม positive control และกลุ่มที่ 6 พยาธิเลี้ยง 0.1% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม ใช้พยาธิจำนวน 40 ตัวต่อความเข้มข้นและพยาธิ 10 ตัวต่อความเข้มข้นต่อช่วงการสังเกตการณ์ โดยสังเกตการเคลื่อนไหวและการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C, 5 % CO₂ ดังแสดงในตารางที่ 1 ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง หลังจากนั้นนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงผ่าน

ตารางที่ 1 การทดสอบผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin ต่อพยาธิตัวกลม *H.placei* และ พยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ กัน

ยากำจัดพยาธิและสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	จำนวนพยาธิที่ใช้ทดสอบ ในแต่ละช่วงเวลา			
	3 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
กลุ่มควบคุม (0.1% DMSO)	10	10	10	10
Plumbagin @ 0.01 µg/ml	10	10	10	10
Plumbagin @ 0.1 µg/ml	10	10	10	10
Plumbagin @ 1.0 µg/ml	10	10	10	10
Plumbagin @ 10 µg/ml	10	10	10	10
Albendazole @ 10 µg/ml	10	10	10	10

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูลและวิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การประเมินผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัด *plumbagin* ในการฆ่าพยาธิตัวกลม *H. placei* และ พยาธิใบไม้กระเพาะ *P. cervi* และทำลายผิวของพยาธิ (Tegumental surface)

การประเมินการมีชีวิตของพยาธิ พิจารณาโดยดูจากคะแนนการเคลื่อนไหวและการติดสี methylene blue ดังนี้

3 = พยาธิเคลื่อนที่ทั้งตัว

2 = พยาธิเคลื่อนที่บางส่วน of ตัว

1 = พยาธิไม่มีการเคลื่อนไหว (ไม่มีการติดสี methylene blue) ภาพที่ 1

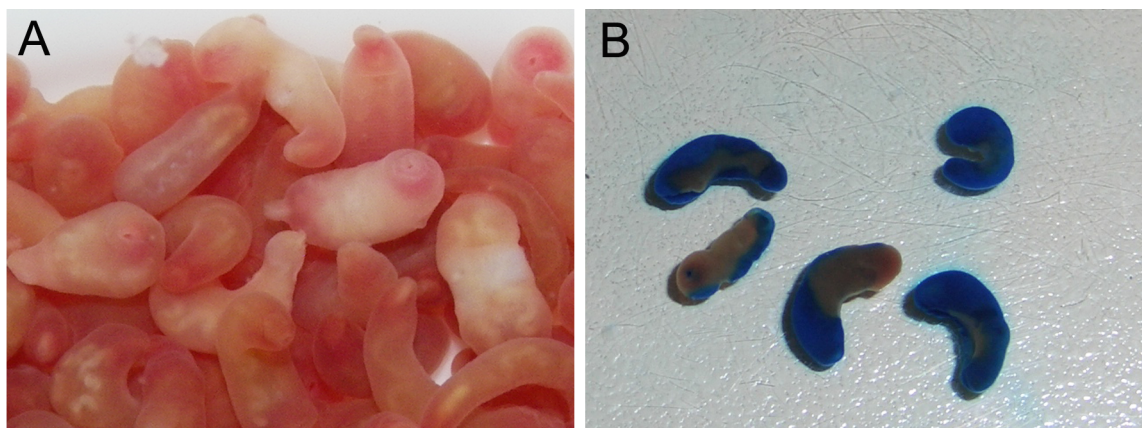
0 = พยาธิไม่มีการเคลื่อนไหว (มีการติดสี methylene blue) ภาพที่ 1

หมายเหตุ: พยาธิที่ไม่เคลื่อนไหวจะถูกย้อมด้วยสี 1 % methylene blue เป็นเวลา 2 นาที, สีสันเกินถูกล้างออกด้วย 0.85 % NaCl หลังจากนั้นนำมาคำนวณและสร้างกราฟความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิ และความเข้มข้นของสารที่ทดสอบแต่ละชนิดตามวิธีของ Kiuchi et al. (1987) จากสูตร

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

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

n = คะแนนการเคลื่อนไหวของพยาธิแต่ละตัว N = จำนวนพยาธิที่สังเกตการณ์เคลื่อนไหวแต่ละช่วงเวลา



ภาพที่ 1 แสดงการประเมินการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะ *P. cervi* ที่ไม่มีการเคลื่อนไหว ด้วย methylene blue (vital dye) ตัวที่ติดสีน้ำเงินเข้ม (B) แสดงว่าตาย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่ติดสี (A)

การเก็บสุ่มตัวอย่างพยาธิ

หลังจากศึกษาค่า relative motility value แล้ว พยาธิแต่ละการทดลอง จะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างจากแต่ละช่วงเวลาสังเกตการณ์เพื่อประเมินการถูกทำลายของผิวพยาธิตัวกลม *H. placei* และ พยาธิใบไม้กระเพาะ *P. cervi* โดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological technique) โดยนำพยาธิที่ตายนำมาดองด้วย 10% neutral buffered formalin เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำพยาธิมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ โดยการดองน้ำออกด้วยการใช้แอลกอฮอล์แล้วฝังเนื้อเยื่อลงในเทียน ตัดเนื้อเยื่อพยาธิแล้วนำไปย้อม

สี hematoxylin และ eosin ศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (bright-field microscope)

สถานที่ดำเนินการทดลอง

หน่วยวิจัยพยาธิใบไม้ในตับ *Fasciolar gigantica* ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตพญาไท เป็นสถานที่ทำการทดลองและเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับย้อมด้วย H&E

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการวิจัย

การประเมินผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรในการฆ่าพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* และทำลายผิวของพยาธิ (Tegumental surface)

หลังจากการเก็บตัวอย่างพยาธินำมาล้างด้วยสารละลาย 0.9% NaCl เพื่อคัดเลือกพยาธิที่มีความสมบูรณ์และการเคลื่อนไหวดี นำมาทดลองในอาหารเชื้อ M-199 เลี้ยงพยาธิที่มีสารสกัดบริสุทธิ์ plumbagin ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01, 0.1, 1.0, และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนกลุ่ม positive control ใช้ albendazole (ABZ) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็น positive control และเนื่องจากสารละลาย plumbagin ละลายใน 0.1% DMSO จึงผสม 0.1% DMSO ในกลุ่ม negative control เพื่อควบคุมผลของ DMSO ที่มีต่อพยาธิทั้งสองชนิด สังเกตการเคลื่อนไหวและการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิที่ 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo-microscope โดยพยาธิที่ไม่เคลื่อนไหวภายใน 5 นาที นำไปทดสอบการตาย โดยใช้ methylene blue หากติดสีหมายถึงพยาธิตาย หลังจากนั้นนำมาคำนวณหาความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิกับระยะเวลาที่ความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบแต่ละชนิด ส่วนพยาธิที่สุ่มมาถูกนำไปผ่านขบวนการเทคนิคทางเนื้อเยื่อต่อไป

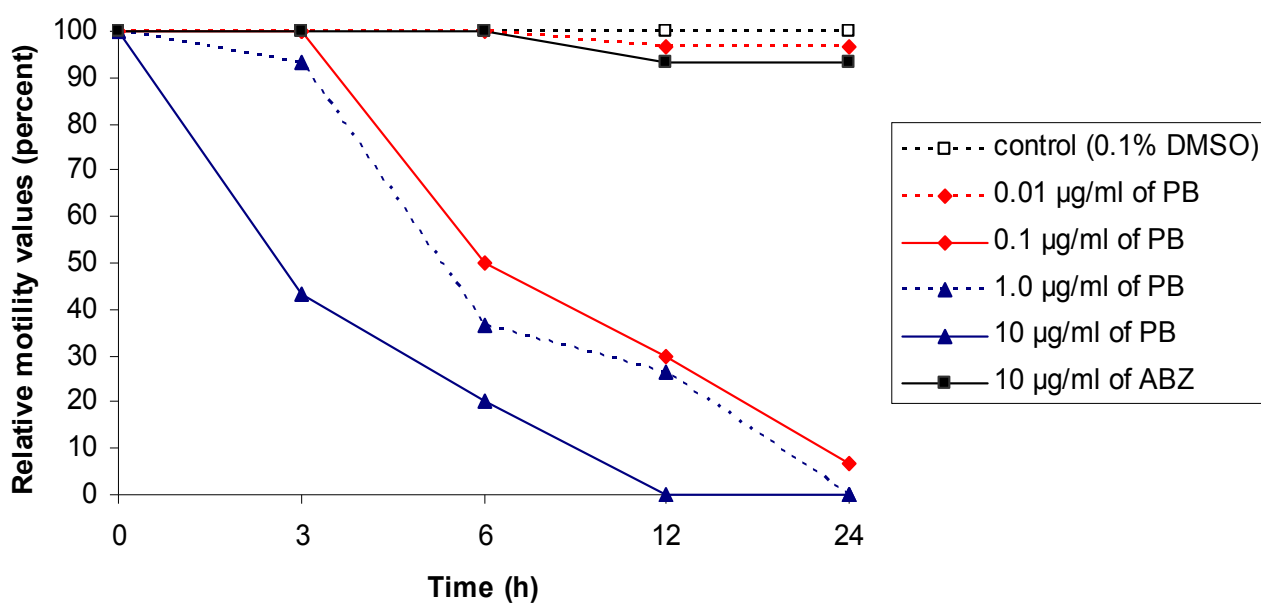
ผลการเปรียบเทียบของค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (relative motility - RM values) ของพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* ที่แช่ใน ABZ และ plumbagin ที่ระยะเวลาต่างๆ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2 และ 3) พบว่าหลังจากผ่านไป 3 ชั่วโมง พยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* ที่แช่ในสารสกัด plumbagin ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ยังเคลื่อนไหวได้ดี (RM =100,100) ตามลำดับ ส่วนพยาธิที่ถูกทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัด plumbagin ที่ขนาด 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าพยาธิบางตัวเริ่มการเคลื่อนไหวบางส่วนและบางตัวไม่เคลื่อนไหว (RM= 93,43) ตามลำดับ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereomicroscope พบว่าในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ผิวพยาธิเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อนำมาย้อมสี methylene blue ไม่ติดสี ซึ่งแสดงว่ายังไม่ตายแต่ไม่เกิดการเคลื่อนไหว ในขณะที่พยาธิที่ทดสอบสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าพยาธิไม่มีการเคลื่อนไหว ลำตัวติดสีน้ำตาลเข้ม มีผลพุงรอบๆตัวและติดสีของ methylene blue ชัดบางส่วน (ภาพที่ 3) ส่วนพยาธิที่อยู่ในยา ABZ ยังเคลื่อนไหวได้ดี (RM =100) การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* ที่ชั่วโมงที่ 6 พบว่าพยาธิส่วนใหญ่เคลื่อนไหวช้าลงและส่วนใหญ่เคลื่อนไหวเป็นบางส่วน ผิวพยาธิเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด plumbagin RM ของพยาธิที่อยู่ในสารสกัด plumbagin มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% ในทุกกลุ่ม ยกเว้นพยาธิอยู่ในสารสกัด plumbagin ที่ขนาด 0.01 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าพยาธิยังเคลื่อนไหวได้ดี ส่วนกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มยังเคลื่อนไหวได้ดีเช่นเดียวกัน เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงพบว่าพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนใหญ่พยาธิไม่ค่อยเคลื่อนไหว (RM= 30, 27) ตามลำดับ เห็นเศษของผิวพุงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พยาธิติดสี methylene blue บางส่วนแสดงว่ายังมีชีวิตอยู่ แต่พยาธิในกลุ่มที่ทดสอบสารสกัด plumbagin ที่ขนาด 10 $\mu\text{g/ml}$ พยาธิไม่เคลื่อนไหว ผิวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและติดสี methylene blue ทั้งตัว (RM =0) พยาธิในกลุ่มที่ทดสอบด้วยยา ABZ (positive

control) พบว่ามีพยาธิส่วนใหญ่ยังเคลื่อนไหวได้ดี แต่มีบางตัวเคลื่อนไหวน้อยลง โดยเคลื่อนไหวเป็นบางส่วน (RM =97) เมื่อพยาธิไปไม้กระเพาะ *P.cervi* ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าพยาธิในกลุ่มที่ได้สารสกัด plumbagin 1.0 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พยาธิตายหมด (RM=0,0) ยกเว้นพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ พยาธิบางตัวยังไม่ตายแต่ไม่เคลื่อนไหว ส่วนพยาธิในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด plumbagin 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนใหญ่ยังเคลื่อนไหวได้ดี (RM =97) ส่วนกลุ่ม positive control พบว่าพยาธิส่วนใหญ่ยังเคลื่อนไหวได้ดี มีเพียงบางตัวที่เคลื่อนไหวบางส่วน (RM = 93) และในกลุ่มควบคุมพยาธิเคลื่อนไหวได้ดี (RM=100)

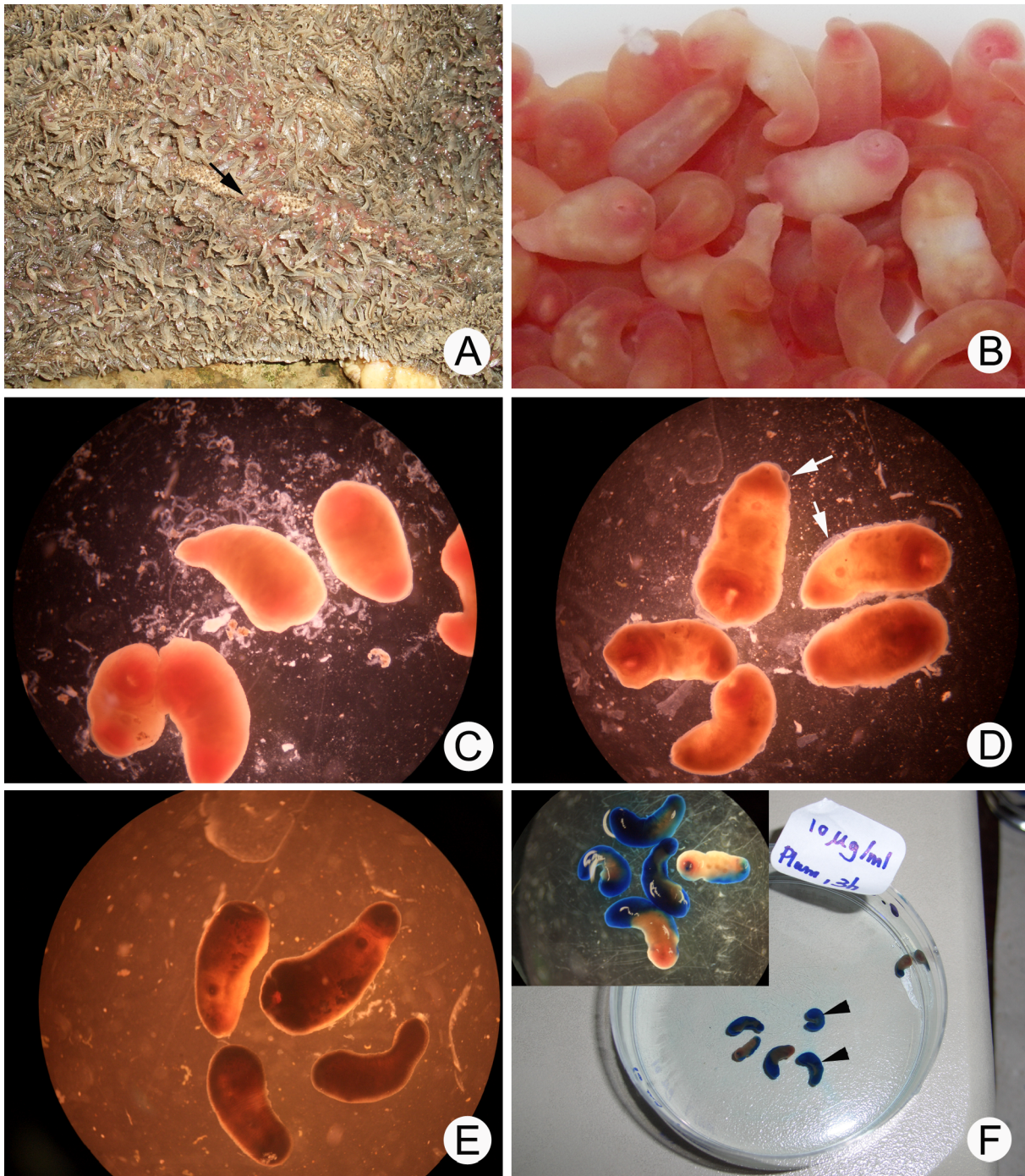
ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* เทียบกับกลุ่มควบคุม หลังได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มพยาธิใบไม้กระเพาะ <i>P.cervi</i> ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	ค่าเฉลี่ยของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะ <i>P.cervi</i> (เปอร์เซ็นต์)				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24
กลุ่มควบคุม (0.1% DMSO)	100	100	100	100	100
Plumbagin @ 0.01 µg/ml	100	100	100	97	97
Plumbagin @ 0.1 µg/ml	100	100	50	30*	7*
Plumbagin @ 1.0 µg/ml	100	93	37*	27*	0*
Plumbagin @ 10 µg/ml	100	43	20*	0*	0*
Albendazole @ 10 µg/ml	100	100	100	93	93

* แสดงค่าเฉลี่ยแต่ละสัณฐานที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

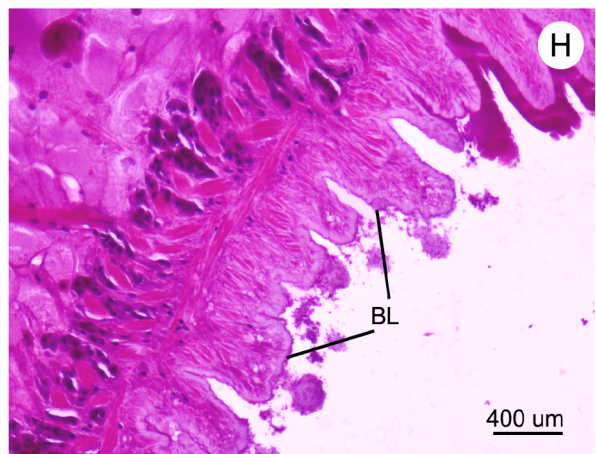
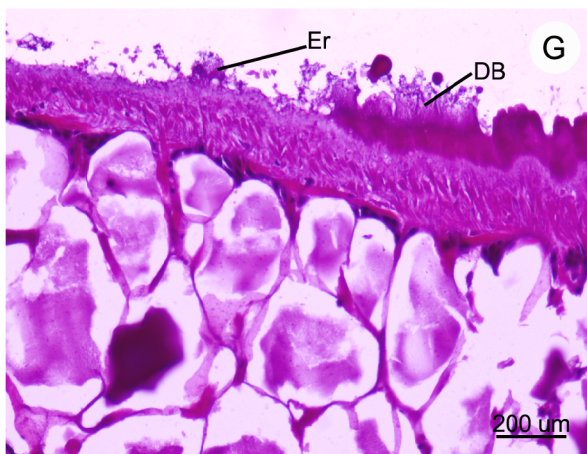
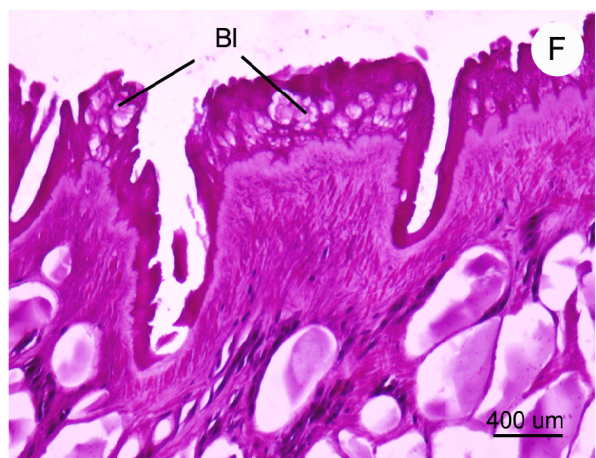
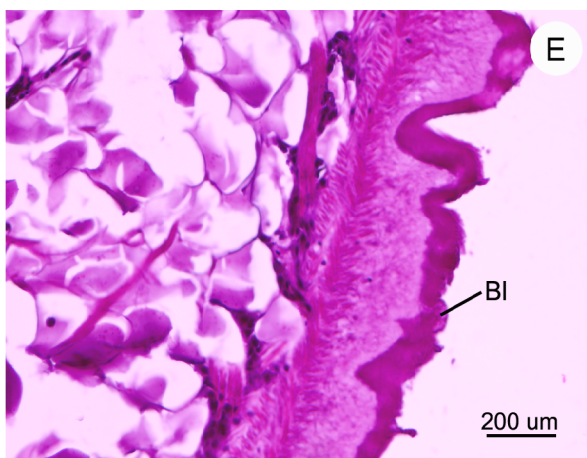
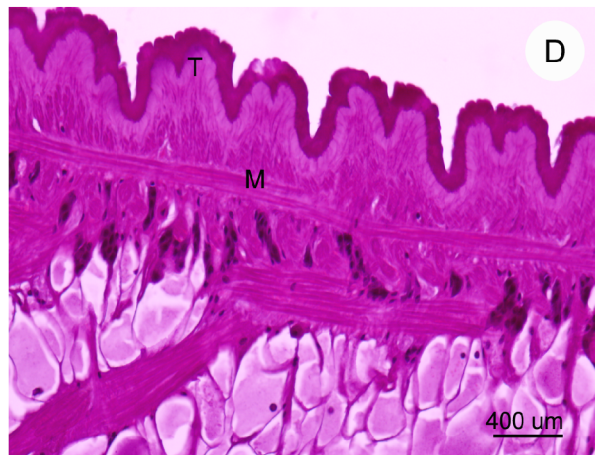
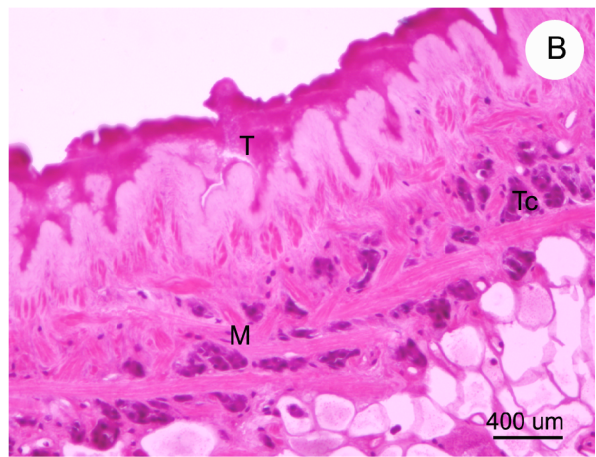
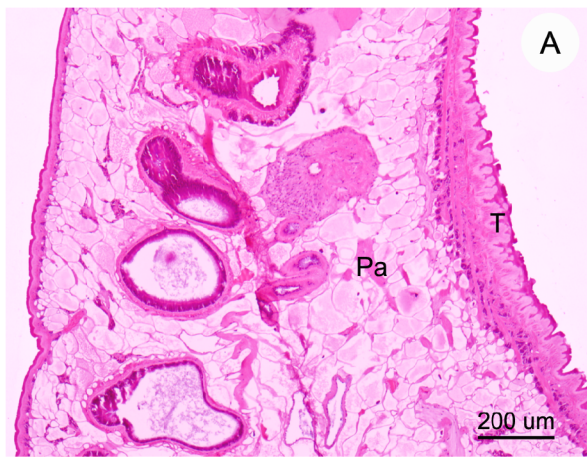


ภาพที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว relative motility (RM) values ของพยาธิใบไม้กระเพาะ *Paramphistomum cervi* ที่ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12 และ 24 หลังได้รับ albendazole (ABZ) หรือ สารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 3 แสดงพยาธิใบไม้กระเพาะ *Paramphistomum cervi* ที่พบในกระเพาะวัว (A) และเมื่อนำมาล้างด้วย 0.85% NaCl (B) พยาธิถูกนำมาทดสอบสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆแล้ว สังเกตการเคลื่อนไหวและการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ stereomicroscope ที่ช่วงโม่งที่ 3 (C-D) กลุ่มควบคุม (C) เทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เห็นผิวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและพบเศษของผิวพยาธิบวมและหลุดลอก (ลูกศรขาว)(D) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ที่ 12 ชั่วโมงพบว่าพยาธิเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ (E) ทดสอบการตายของพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* ด้วย methylene blue (vital dye) พบว่าติดสีน้ำเงินทั้งตัว (หัวลูกศรสีดำ, F) กำลังขยายเท่ากับ 20X

เมื่อศึกษาพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อ (histopathology) ในพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin เทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4) ลักษณะจุลกายวิภาคศาสตร์ของพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* พบว่าชั้นผิวของพยาธิจากด้านนอกเข้าด้านในประกอบด้วยชั้น tegumental layer ซึ่งมีลักษณะหน้าด้าน ventral surface ส่วนด้าน dorsal surface บางกว่า ventral ในชั้น tegument มีลักษณะคล้ายลูกคลื่นเป็นลอนๆเห็นร่องลึกกว่าด้าน dorsal surface ใต้ต่อชั้น tegument เป็นชั้นกล้ามเนื้อเรียงตัว 3 ชั้น สานตามแนวขวาง แนวยาว และแนวเฉียง ระหว่างแนวกล้ามเนื้อทั้งสามพบ tegumental cell ซึ่งเป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยม ที่ทำหน้าที่สร้างผิวและสารเคลือบผิวของพยาธิ ลึกลงไปในกลางตัวพยาธิถูกบุด้วย parenchymal cell และอวัยวะเกี่ยวข้องกับทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ ส่วนโครงสร้างของพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.01 $\mu\text{g/ml}$ เหมือนกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4C และ D) พยาธิมีทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ การเปลี่ยนแปลงของผิวโดยมีดังขั้นตอนต่อไปนี้คือ บริเวณผิวของพยาธิเกิดตุ่มพองเล็กๆ กระจายตามตัวพยาธิและตุ่มพองนั้นเริ่มขยายใหญ่ขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 4E และ F) ต่อมาตุ่มพองแตก ทำให้ผิวของพยาธิสัมผัสสารสกัดมากขึ้นและมีการหลุดลอกของผิวของพยาธิในที่สุด จนบางแห่งของพยาธิไม่มีผิวปกคลุมเห็นส่วนที่เป็น basal lamina (ภาพที่ 4G และ H)



ภาพที่ 4 แสดงจุลพยาธิฐานของพยาธิใบไม้กระเพาะ *Paramphistomum cervi* ที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆเทียบกับควบคุม (A-H) (A) ผิวของพยาธิประกอบด้วยชั้น tegumental layer (T) มีลักษณะเป็นลอนๆภายในใจกลางลำตัวถูกบุด้วย parenchymal cell (Pa) (B) ภาพขยายของผนังลำตัวของพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* แสดงโครงสร้างชั้น tegument (T) และชั้นกล้ามเนื้อ (muscle : M) :ซึ่งมี tegumental cell (Tc) แทรกหว่างแนวเส้นใยของกล้ามเนื้อ (C) แสดงโครงสร้างภายในพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 (C-D) พบว่าโครงสร้างภายในไม่เปลี่ยนแปลงแต่พยาธิที่ทดสอบสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ (E-H) พยาธิมีการเปลี่ยนแปลงของผิวโดยเริ่มมีตุ่มพองเล็กๆ (bleb: BL) กระจายตามตัวพยาธิและตุ่มพองนั้นเริ่มขยายใหญ่ขึ้นตามลำดับ (E และ F) ต่อมาตุ่มพองแตกออก (disrupt blebs : DB) และมีการหลุดลอกของผิวของพยาธิ (erosion: Er) จนเห็นส่วนที่เป็น basal lamina (BL)

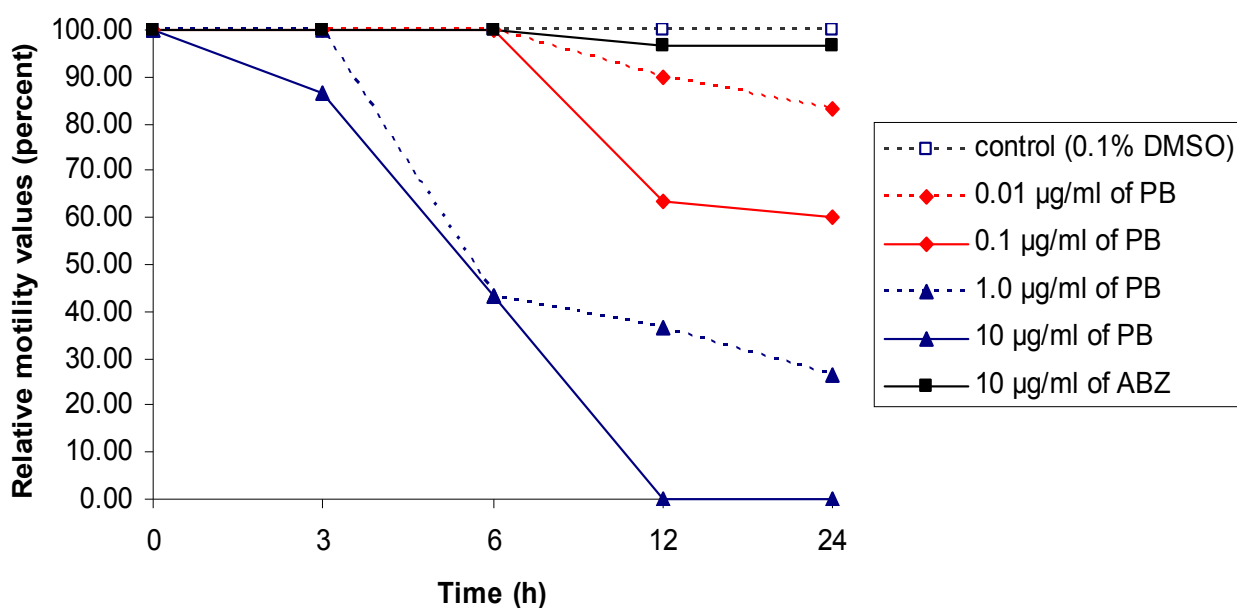
การประเมินผลของยากำจัดพยาธิและสารสกัดสมุนไพรในการฆ่าพยาธิตัวกลม *H.placei* และทำลายผิวของพยาธิ (Tegumental surface)

ผลการเปรียบเทียบของค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว (relative motility - RM values) ของพยาธิตัวกลม *H.placei* ที่ทดสอบด้วย ABZ และ plumbagin ที่ระยะเวลาต่างๆ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5) พบว่าหลังจากผ่านไป 3 ชั่วโมง พยาธิตัวกลม *H.placei* ที่ทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ความเข้มข้น 0.01 – 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ยังเคลื่อนไหวได้ดี (RM =100) ยกเว้นกลุ่มที่ทดสอบด้วย plumbagin 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าพยาธิบางตัวเริ่มการเคลื่อนไหวบางส่วน (RM= 83) กลุ่มที่ทดสอบด้วย ABZ ยาเคลื่อนไหวได้ดีเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม (RM= 100,100) ตามลำดับ หลังจากนั้นชั่วโมงที่ 6 พบว่าการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลม *H.placei* ในกลุ่มที่ทดสอบสารสกัด plumbagin 1.0 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ นั้น พยาธิส่วนใหญ่เคลื่อนไหวช้าลงและเคลื่อนไหวเป็นบางส่วน ค่า RM เท่ากับ 43, 43 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มพยาธิที่ทดสอบด้วย ABZ และ สารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ เคลื่อนไหวได้ดี (RM=100) เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงพบว่าพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.01 - 1.0 $\mu\text{g/ml}$ เคลื่อนไหวช้าลงจากชั่วโมงที่ 6 ค่า RM เท่ากับ 90, 63 และ 37 เรียงตามลำดับความเข้มข้นของสารสกัด plumbagin แต่พยาธิในกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่เคลื่อนไหว ตัวพยาธิเปลี่ยนจากที่ชมพูเป็นสีน้ำตาลเข้ม จึงนำไปทดสอบด้วย methylene blue ปรากฏว่า ติดสีน้ำเงินเข้ม แสดงว่าพยาธิตายแล้ว (RM =0) พยาธิในกลุ่มที่ทดสอบด้วยยา ABZ (positive control) พบว่ามีพยาธิส่วนใหญ่ยังเคลื่อนไหวได้ดี แต่มีบางตัวเคลื่อนไหวน้อยลง โดยเคลื่อนไหวเป็นบางส่วน (RM =97) เมื่อพยาธิตัวกลม *H.placei* ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าพยาธิในกลุ่มที่ได้สารสกัด plumbagin 0.01 และ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ พยาธิเคลื่อนไหวบางส่วนและมีบางตัวไม่เคลื่อนไหว แต่ไม่ตายเนื่องจากไม่ติดสี methylene blue (RM=83, 60) ตามลำดับ ส่วนพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ยังมีการเคลื่อนไหวเป็นบางส่วนของพยาธิ ยกเว้นพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้นที่พยาธิตายหมด ส่วนกลุ่ม positive control พบว่าพยาธิส่วนใหญ่ยังเคลื่อนไหวได้ดี มีเพียงบางตัวที่เคลื่อนไหวบางส่วน (RM = 97) และในกลุ่มควบคุมพยาธิเคลื่อนไหวได้ดีตลอดการทดลอง (RM=100) ลักษณะภายในมองด้วยตาเปล่าไม่เป็นการเปลี่ยนของโครงสร้างและในจานเลี้ยงเชื้อก็ไม่มีเศษของผิวพยาธิตัวกลม

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลม *H.placei* เทียบกับกลุ่มควบคุม หลังได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

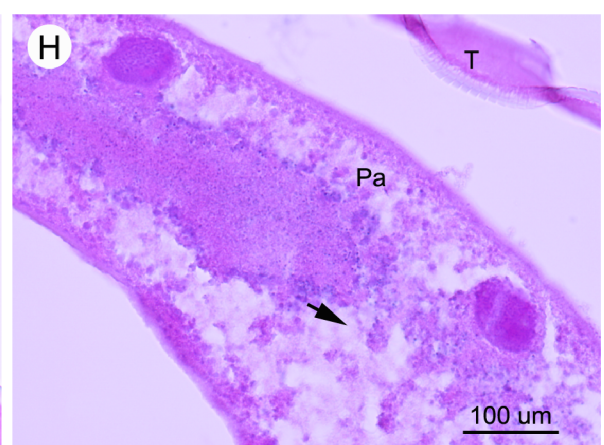
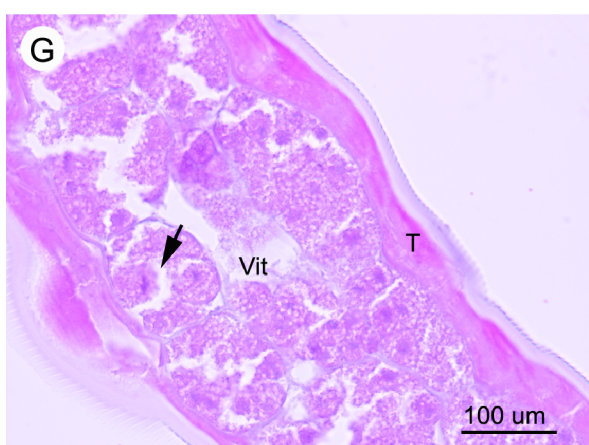
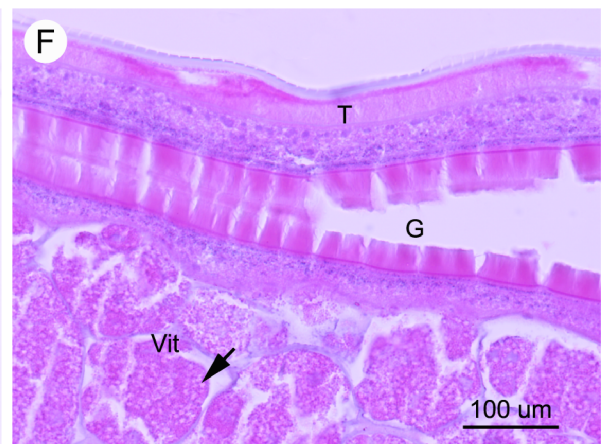
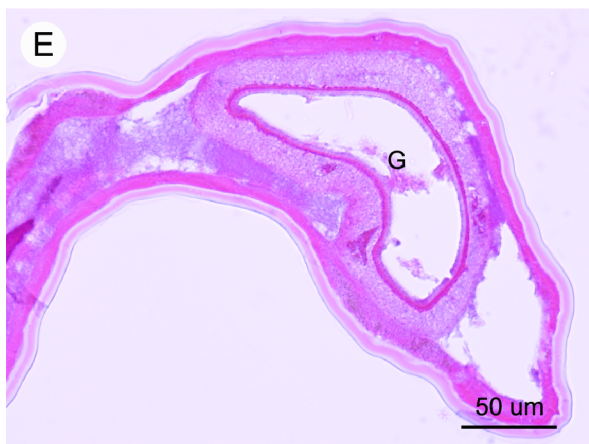
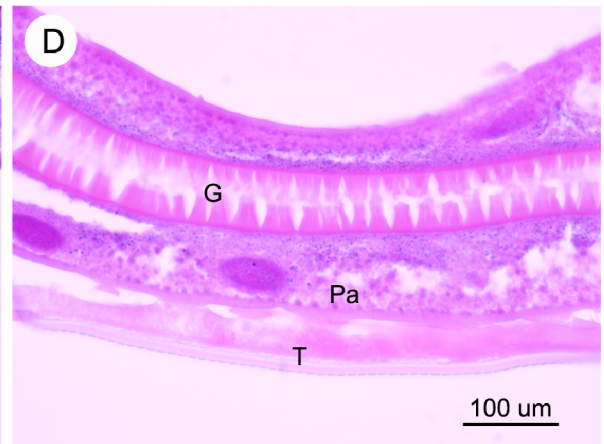
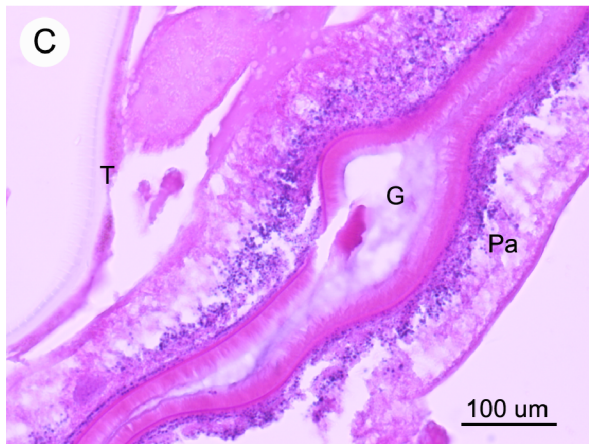
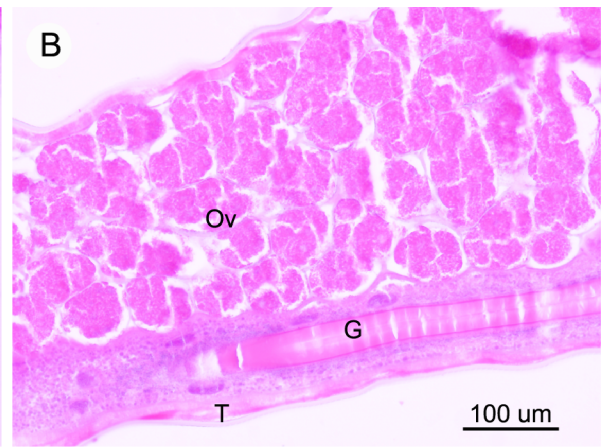
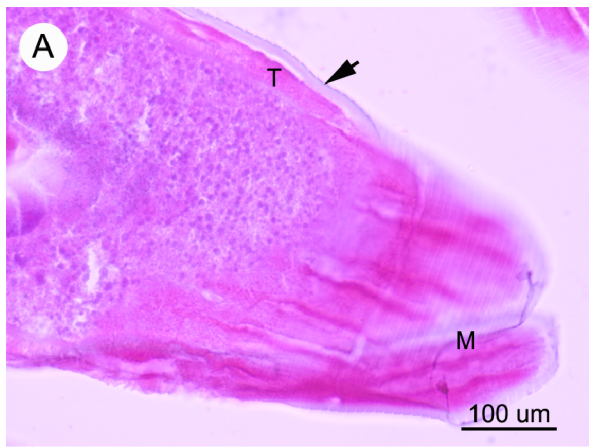
กลุ่มพยาธิตัวกลม <i>H.placei</i> ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	ค่าเฉลี่ยของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลม <i>H.placei</i> (เปอร์เซ็นต์)				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24
กลุ่มควบคุม (0.1% DMSO)	100	100	100	100	100
Plumbagin @ 0.01 µg/ml	100	100	100	90	83
Plumbagin @ 0.1 µg/ml	100	100	100	63	60
Plumbagin @ 1.0 µg/ml	100	100	43	37*	27*
Plumbagin @ 10 µg/ml	100	87	43	0*	0*
Albendazole @ 10 µg/ml	100	100	100	97	97

* แสดงค่าเฉลี่ยแต่ละสัณฐานที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละของความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว relative motility (RM) values ของพยาธิตัวกลม *Haemonchus placei* ที่ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12 และ 24 หลังได้รับ albendazole (ABZ) หรือสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อ (histopathology) ในพยาธิตัวกลม *H.placei* ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin เทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 6) ลักษณะจุลกายวิภาคศาสตร์ของพยาธิตัวกลม *H.placei* ในกลุ่มควบคุมพบว่าภายนอกมีเปลือกหุ้มเป็นวงกลมวิ่งตามขวางของลำตัวตั้งแต่หัวถึงหาง โดยมีสันนูนคล้ายหนามวิ่งอยู่ทางด้านข้างรอบตัว ส่วนชั้นผิวของพยาธิจากด้านนอกเข้าด้านในประกอบด้วยชั้น tegumental layer ซึ่งมีลักษณะเรียบ ส่วนใต้ต่อชั้น tegument เป็นกล้ามเนื้อและลึกลงไปในกลางตัวพยาธิถูกบุด้วย parenchymal cell และอวัยวะเกี่ยวข้องกับทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ โดยพบอวัยวะสืบพันธุ์คู่อยู่ทางด้านหลังของลำตัวพยาธิ (ภาพที่ 6A-D) กลุ่มพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.01-10 $\mu\text{g/ml}$ มีลักษณะภายนอกเหมือนกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 6E-H) เนื่องจากมีเปลือกหุ้มตัวพยาธิชนิดอยู่ ทำให้โครงสร้างภายนอกไม่แตกต่าง เมื่อดูโครงสร้างภายในของพยาธิในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ tegument และทางเดินอาหาร แต่ส่วนที่เป็น parenchymal cell มีลักษณะเปลี่ยนแปลงและเซลล์ที่ทำหน้าที่การสร้างเปลือกไข่ (vitelline cell) มีลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) หรือมีการสลายโครงสร้างภายใน vitelline cell (ภาพที่ 6F-H)



ภาพที่ 6 แสดงจุลพยาธิฐานของพยาธิตัวกลม *H.placei* ที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับควบคุม (A-H) (A) ผิวของพยาธิในกลุ่มควบคุมส่วนหัวมีปาก (mouth :M) ถูกปกคลุมด้วยปลอกหุ้มรอบตัว (ลูกศร) ภายในประกอบด้วยชั้น tegumental layer (T) มีลักษณะแบนยาวตามความยาวของพยาธิ (B-D) ภาพของผนังลำตัวของพยาธิตัวกลม *H.placei* แสดงโครงสร้างชั้น tegument (T) และชั้นกล้ามเนื้อ (muscle : M) ซึ่งมี tegumental layer (T) ถัดจาก tegumental layer มีกล้ามเนื้อและภายในกลางลำตัวถูกบุด้วย parenchymal cell (Pa) และทางเดินอาหาร (Gut:G) ส่วนครึ่งท้ายของตัวพยาธิพบระบบสืบพันธุ์ ทั้งเพศผู้และเพศหญิง ซึ่งในภาพพบส่วนที่เป็นรังไข่ (oviduct: Ov) (E-F) แสดงโครงสร้างภายในพยาธิที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ (C) พยาธิในกลุ่มที่ทดสอบด้วย plumbagin ความเข้มข้น 0.01 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าโครงสร้างภายในไม่เปลี่ยนแปลง แต่พยาธิที่ถูกทดสอบสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (D-H) พยาธิมีการเปลี่ยนแปลงของ parenchymal cell และ vitelline cell โดยมีลักษณะ apoptosis ภายในเซลล์ (ลูกศร)

อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองทดสอบผลของสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงต่อพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* และพยาธิตัวกลม *H.placei* พบว่าสารสกัด plumbagin ยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิทั้งสองชนิด จากการประเมินค่า RM value ผีที่ปกคลุมพยาธิ *P.cervi* ได้รับความเสียหายในขณะที่พยาธิตัวกลม *H.placei* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากพยาธิตัวกลม *H.placei* มีเปลือกหุ้มอยู่ทำให้สารสกัด plumbagin เข้าผ่านเปลือกหุ้มได้ยาก จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัด plumbagin มีไม่ค่อยมีผลต่อพยาธิ *P.epiclitum* (Atjanasuppat et al., 2009) แต่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนไหวของ macrofilialia ชนิด *Setaria digitata* ภายใน 24 ชม.(Srinivasan et al., 2009) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ว่าสารสกัด plumbagin มีผลต่อผลทั้งตัวกลมและตัวแบน ซึ่งอาจจะมีผลต่อพยาธิตัวตืดก็ได้ จึงควรนำไปศึกษาในอนาคต

ในท้องตลาดสารฆ่าพยาธิ ABZ นิยมใช้ฆ่าพยาธิตัวแบนทั้งในคนและในสัตว์ (Horton, 2000; Solana et al., 2001; Buchanan et al., 2003; Atjanasuppat et al., 2009; Hossain et al., 2012) ข้อเสียจากการใช้ยาฆ่าพยาธิคือ ต้องให้ยาสดอย่างสม่ำเสมอ จึงทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงและอาจมีการดื้อยาตามมา ดังนั้นการมองหาทางเลือกในการใช้ยากำจัดพยาธิที่มาจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเช่น สมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่ควรมีการศึกษา ในการทดลองที่นำเสนอนี้เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงกับผลของ albendazole (ABZ) ที่มีต่อพยาธิตัวกลมในทางเดินอาหาร *Haemonchus placei* และพยาธิใบไม้กระเพาะ *Paramphistomum cervi* จึงใช้ ABZ เป็นตัวเปรียบเทียบกับสารสกัด plumbagin พบว่าสารสกัด plumbagin ได้ผลดีกว่า ABZ ทั้งค่า RM value และพยาธิสภาพของพยาธิทั้งสองชนิดหลังได้รับสารสกัดพบว่าการบวมของ tegument ของ พยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* เป็นตุ่มน้ำ tegument เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงดำสามารถมองด้วยตามเปล่าและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound bright field ส่วนสำคัญพยาธิอย่างหนึ่งคือ tegument เพราะทำหน้าที่ปกคลุมพยาธิมีหน้าที่ช่วยรักษาสมดุลภายในตัวพยาธิกับสิ่งแวดล้อมภายนอก หาก tegument ของพยาธิเกิดพยาธิสภาพจะทำให้การรักษาสมดุลในร่างกายของพยาธิเสียไป(Stitt and Fairweather, 1993) จะเกิดการตอบสนองต่อภาวะเครียด (stress situation) โดยการขับเคลื่อนของอิเล็กตรอนที่บริเวณ tegument เปลี่ยนไป (Skuce et al.,1987) ทำให้เกิดการบวมตามมา สารสกัด plumbagin เป็นอนุพันธ์ของ naphthoquinone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเป็น 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ในพยาธิ *Plasmodium falciparum* โดยการทำให้เกิด lipid peroxidation (Nakornchai,et al.,1993) จึงเป็นไปได้ว่ากลไกการเกิด oxidative stress นี้เกิดในพยาธิทั้งสองชนิดนี้เหมือนกับใน *P. falciparum*

ABZ เป็นอนุพันธ์ของ benzimidazole derivative ที่ทำปฏิกิริยากับ b-tubulin ของ microtubule ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการขนส่ง secretory granules ไปยังด้านบนของ tegument ทำให้ tegument บางไม่สามารถรักษา osmotic balance ได้ (Stitt and Fairweather, 1993) ดังนั้นการเกิดพยาธิสภาพกับ tegument จึงตามมาเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ tegument เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับ nitroxylin และสารสกัดหยาบปวกหาด 2,4,30,50-tetrahydroxystilbene (THS) (Saowakon et al., 2009) ดังนั้นสารสกัด plumbagin ที่สกัดที่ได้จากรากเจตมูลเพลิงแดงจึงสามารถใช้เป็นยาฆ่าพยาธิระยะตัว

เต็มวัยทั้ง *P.cervi* และ *H.placei* ซึ่งต้องศึกษาต่อไปว่าผลของสารสกัด plumbagin ในพยาธิชนิดอื่นๆในระบบทางเดินอาหารและพยาธิตัวที่ตอบสนองได้ดีหรือไม่

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบผลของสารสกัด plumbagin เทียบกับกลุ่มควบคุมในพยาธิตัวกลม *H.placei* และพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* โดยประเมินจากค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวและการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ จากการศึกษารelative motility (RM) โดยให้คะแนนการเคลื่อนไหวและการย้อมสีการตายของพยาธิด้วย methylene blue พบว่าพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ขนาด 0.01 – 10 $\mu\text{g/ml}$ มีการเคลื่อนไหวลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ถึงชั่วโมงที่ 24 โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ 10 $\mu\text{g/ml}$ ตายหมดทุกตัวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ส่วนพยาธิที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีการเคลื่อนไหวเป็นบางส่วนและมีบางตัวไม่เคลื่อนไหว แต่ยังไม่ตาย ทำให้ค่า RM values ที่ปรากฏน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 24 พยาธิในสองกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนไหว แต่ติดสี methylene blue เกือบทั้งตัว เมื่อเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin กับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัด plumbagin มีผลลดการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของพยาธิพบว่าส่วน tegument มีลักษณะเป็นตุ่มพองเล็กๆ กระจายที่ผิว หลังจากนั้นตุ่มพองใหญ่ขึ้นจนกระทั่งแตก และหลุดออกจากตัวพยาธิเมื่อยิ่งให้พยาธิแช่อยู่ในสารสกัด plumbagin นาน จึงทำให้เห็นเศษผิวของพยาธิอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลังทำการทดสอบผลของสารสกัด plumbagin เทียบกับกลุ่มควบคุมในพยาธิตัวกลม *H.placei* พบว่าพยาธิตัวกลม *H.placei* ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin ที่ขนาด 0.01 – 10 $\mu\text{g/ml}$ มีการเคลื่อนไหวลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 24 โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ 10 $\mu\text{g/ml}$ ตายหมดทุกตัวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ส่วนพยาธิที่ได้รับสารสกัด plumbagin ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีการเคลื่อนไหวเป็นบางส่วนและมีบางตัวไม่เคลื่อนไหว แต่ยังไม่ตาย ทำให้ค่า RM values อยู่ที่ 43% เมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 24 พยาธิในสองกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เคลื่อนไหวเป็นบางส่วนและไม่เคลื่อนไหว แต่ติดสี methylene blue บางแห่ง เมื่อเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละการความสัมพันธ์การเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้กระเพาะที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด plumbagin กับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัด plumbagin มีผลลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของพยาธิพบว่าส่วน tegument ไม่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงคือ parenchymal cell และ vitelline cell ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายนอกของพยาธิชนิดนี้

เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อสารสกัด plumbagin ในพยาธิตัวกลม *H.placei* และพยาธิใบไม้กระเพาะ *P.cervi* (พยาธิตัวแบน) พบว่าสารสกัด plumbagin มีผลต่อการเคลื่อนไหวและการเปลี่ยนแปลง

โครงสร้างผิวพยาธิได้ดีกว่า ดังนั้นสารสกัด plumbagin อาจจะพัฒนาเป็นยาถ่ายพยาธิในพยาธิตัวแบนในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เท้ากบได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของสารสกัด plumbagin ต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างส่วนผิวของพยาธิ พบว่าสารสกัด plumbagin มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิ โดยประเมินจากค่าความสัมพันธ์การเคลื่อนไหว เมื่อให้สารสกัด plumbagin มีความเข้มข้นมากขึ้น พยาธิมีการเคลื่อนไหวลดลง และเมื่อพยาธิแช่ในสารสกัดสาร plumbagin นานขึ้นที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิให้เคลื่อนไหวช้าลงเช่นกัน นอกจากนี้จุลพยาธิกายวิภาคศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงของผิวของพยาธิมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นและระยะเวลาเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและ positive control ดังนั้นแสดงว่าสารสกัด plumbagin ควรมีการศึกษาต่อและอาจจะนำวิธีการทดลองครั้งนี้ไปใช้ในการทดสอบหาสารสกัดหายาจากสมุนไพรธรรมชาติ ที่อาจนำมาใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการฆ่าหรือถ่ายพยาธิและปลอดภัยสำหรับสัตว์ที่ติดเชื้อในอนาคต

บรรณานุกรม

- 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.
- Avirutnant, W., Pongpan, A., 1983. The antimicrobial activity of some Thai flowers and plants. *Mahidol. Univ. J. Pharm. Sci.* 10, 81–86.
- Bakke, T.A., 1976a. Shape, size and surface topography of genital organs of *Leucochloridium* sp. (Digenea) revealed by light and scanning electron microscopy. *Parasitol. Res.* 51, 99–113.
- Bakke, T.A., 1976b. Functional morphology and surface topography of *Leucochloridium* sp. (Digenea), revealed by scanning electron microscopy. *Parasitol. Res.* 51, 115–128.
- Bennett, C.E., 1975. Surface features, sensory structures and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* L. *J. Parasitol.* 61, 886–891.
- Buchanan, J.F., Fairweather, I., Brenna, G.P., Trudgett, A., Hoey, E.M., 2003. *Fasciola hepatica*: surface and internal tegumental changes induced by treatment in vitro with the sulfoxide metabolite of albendazole ('Valbazen'). *Parasitology* 126, 141–153.
- Elango, G., Rahuman, A.A., 2011. Evaluation of medicinal plant extracts against ticks and fluke. *Parasitol. Res.* 108, 513–519.
- Fetterer, R.H., Fleming, M.W., 1991. Effects of plumbagin on development of the parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Ascaris sum.* *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 539–542.
- Geurden, T., Somers, R., Thanh, N.T., Vien, L.V., Nga, V.T., Giang, H.H., Dorny, P., Giau, H.K., Vercruysse, J., 2008. Parasitic infections in dairy cattle around Hanoi, northern Vietnam. *Vet. Parasitol.* 153, 384–388.
- Hanna, R.E.B., Williamson, D.S., Mattison, R.G., Nizami, W.A., 1988. Seasonal reproduction in *Paramphistomum epiclitum* and *Gastrothylax crumenifer*, rumen paramphistomes of the indian water buffalo, and comparison with the biliary paramphistome *Gigantocotyle explanatum*. *Int. J. Parasitol.* 18, 513–521.
- Horak, I.G., 1971. Paramphistomiasis of domestic ruminants. *Adv. Parasitol.* 9, 33–71.
- Hossain, E., Chandra, G., Nandy, A.P., Mandal, S.C., Gupta, J.K., 2012. Anthelmintic effect of a methanol extract of *Bombax malabaricum* leaves on *Paramphistomum explanatum*. *Parasitol. Res.* 110, 1097–1102.

- Horton, J., 2000. Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitology* 121 (Suppl), S113–S132.
- Khan, U.J., Tanveer, A., Maqbool, A., Masood, S., 2008. Epidemiological studies of paramphistomosis in cattle. *Veterinarski Arhiv* 78, 243–251.
- Kiuchi, F., Miyashita, N., Tsuda, Y., Kondo, K., Yoshimura, H., 1987. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 2880–2886.
- Magalhes, L.G., Kapadia, G.J., da Silva Tonuci, L.R., Caixeta, S.C., Parreira, N.A., Rodrigues, V., Da Silva Filho, A.A., 2010. In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol. Res.* 56, 395–401.
- Mathew, N., Paily, K.P., Abidha, Vanamail, P., Kalyanasundaram, M., Balaraman, K., 2002. Macrofilaricidal Activity of the plant *Plumbago indica/rosea* *In vitro*. *Drug Dev. Res.* 56, 33–39.
- Nakornchai, S., 1993. Mechanism of antimalarial action of plumbagin. Research report, Bangkok: Mahidol University, 1–27.
- Nollen, P.M., Nadakavukaren, M.J., 1974. *Megalodiscus temperatus*: scanning electron microscopy of the tegumental surfaces. *Exp. Parasitol.* 36, 123–130.
- Panyarachun, B., Sobhon, P., Tinikul, Y., Chotwiwatthanakun, C., Anupunpisit, V., Anuracpreeda, P., 2010. *Paramphistomum cervi*: surface topography of the tegument of adult fluke. *Exp. Parasitol.* 125, 95–99.
- Prasitirat, P., Chompoochan, T., Nithiuthai, S., Wongkasemjit, S., Punmamoang, T., Pongrut, P., Chinone, S., Itagaki, H., 1997. Prevalence of amphistomes of cattle in Thailand. *Parasitology* 29, 27–32.
- Rolfe, P.F., Boray, J.C., Nichols, P., Collins, G.H., 1991. Epidemiology of paramphistomosis in cattle. *Int. J. Parasitol.* 21, 813–819.
- Saowakon, N., Tansatit, T., Wanichanon, C., Chanakul, W., Reutrakul, V., Sobhon, P., 2009. *Fasciola gigantica*: anthelmintic effect of the aqueous extract of *Artocarpus lakoocha*. *Exp. Parasitol.* 122, 289–298.
- Shalaby, H.A., El Namaky, A.H., Kamel, R.A., Derbala, A.A., 2010. Tegumental surface changes in adult *Paramphistomum microbothrium* (Fischöeder 1901) following in vitro administration of artemether. *J. Helminthol.* 84, 115–122.

- Sharma, P.N., Hanna, R.E., 1988. Ultrastructure and cytochemistry of the tegument of *Orthocoelium scolicoelium* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda: Digenea). J. Helminthol. 62, 331–343.
- Solana, H.D., Rodriguez, J.A., Lanusse, C.E., 2001. Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. Parasitol. Res. 87, 275–280.
- Soulsby, E.J., 1987. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. Immunol. Lett. 16, 315–320.
- Srinivasan, L., Mathew, N., Muthuswamy, K., 2009. In vitro antifilarial activity of glutathione S-transferase inhibitors. Parasitol. Res. 105, 1179–1182.
- Stitt, A.W., Fairweather, I., 1993. *Fasciolar hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). Parasitol. Res. 79, 529–536.
- Tariq, K.A., Chishti, M.Z., Ahmad, F., Shawl, A.S., 2008. The epidemiology of paramphistomosis of sheep (*Ovis aries* L.) in the north west temperate Himalayan region of India. Vet. Res. Commun. 32, 383–391.
- Tandon, V., Pal, P., Roy, B., Rao, H.S.P., Reddy, K.S., 1997. In vitro anthelmintic activity of root-tuber extract of *Flemingia vestita*, an indigenous plant in Shillong, India. Parasitol. Res. 83, 492–498.
- Tandon, V., Mattra, S.C., 1982. Scanning electron microscopic observations on the tegumental surfaces of two rumen flukes (Trematoda: Paramphistomata). J. Helminthol. 56, 95–104.

ประวัติผู้วิจัย

อาจารย์ 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 111 ม.6 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 ส่วนหนึ่งจากการวิจัยครั้งนี้ได้นำเสนอในรูปแบบ poster presentation เรื่อง In vitro effect of purified plumbagin of *Plumbago indica* against motility of *Paramphistomum cervi* ในการประชุมวิชาการ “59th International Congress and Annual Meeting of the Society of Medicinal Plant and Natural Product Research” ณ เมืองอันตัลยา ประเทศตุรกี เมื่อวันที่ 4-9 กันยายน 2554