



ผลของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมโยอีไล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

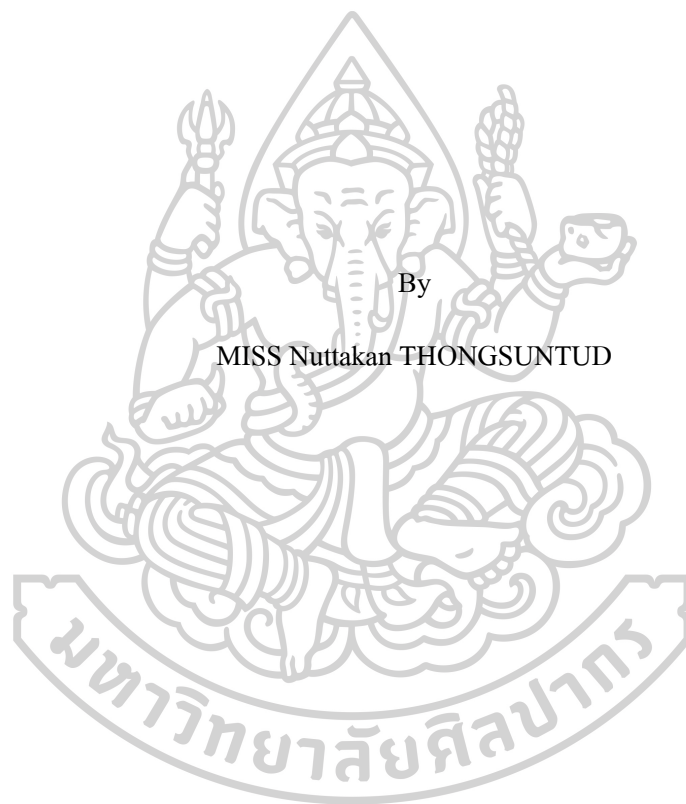
ผลของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมโยอีไล



โดย  
นางสาวนฤตกานต์ ทองสันทัด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EFFECT OF *MITRAGYNA SPECIOSA* (KORTH) HAVIL. EXTRACT IN  
*PLASMODIUM YOELII* (PY) INFECTED MICE.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for Master of Science (FORENSIC SCIENCE)  
Graduate School, Silpakorn University  
Academic Year 2021  
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	ผลของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม โยอีไล
โดย	นางสาวนุศกานต์ ทองสันทัด
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	มูอำหมัด นียมเดชา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	สุพิน ชมภูพงษ์

---

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ  
(ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(มูอำหมัด นียมเดชา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(สุพิน ชมภูพงษ์)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก  
(บุญเดช เบิกฟ้า)

60312303 : นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

คำสำคัญ : สารสกัดใบกระท่อม, มาลาเรีย, หนูทดลอง

นางสาว นุศกานต์ ทองสันต์: ผลของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม โยอีไล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : มูอำหมัด นิยมเดชา

“กระท่อม” โดยเฉพาะส่วนใบของพืช *Mitragyna speciosa* (Korth) Havil. (MS) เป็นพืชที่มีสรรพคุณทางการแพทย์ ในประเทศไทยมักมีการนำไปใช้รักษาอาการที่มีความรุนแรงน้อย เช่น ไข้ ท้องเสีย ใช้ลดภาวะความเครียดความเหนื่อยล้าจากการทำงาน ใช้ลดอาการภาวะเลิกยาเสพติดกลุ่ม opioid ในทางเภสัชวิทยากระท่อมมีฤทธิ์ด้านการไอ การเจ็บปวด ด้านการอักเสบ และด้านอาการท้องร่วง ปัจจุบันยังคงพบรายงานการคือยาของโรคมาลาเรียในทุกปี ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าสารคุณสมบัติใหม่เพื่อนำมาใช้พัฒนาการรักษาโรคมาลาเรียยังคงมีความจำเป็น นำไปสู่การศึกษาถึงประสิทธิผลของสารสกัดจากใบกระท่อมในหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม โยอีไล ใช้ ICR mice ทั้งหมด 7 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว มีระยะเวลาการทดลองทั้งหมด 8 วัน สารสกัดจากใบกระท่อมที่ปริมาณ 75 mg/kg และ 150 mg/kg ถูกเตรียมใน Cosovent อัตราส่วน น้ำกลั่น: Tween 80: propylene glycol ที่ 4:1:4 ในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อของหนูทดลอง การรักษาด้วยสารสกัดจากใบกระท่อม จะถูกป้อนด้วยวิธีทางปากโดยตรง (1 ครั้ง/วัน) ขณะที่ยา artesunate จะถูกใช้เป็นยามาตรฐานด้านเชื้อมาลาเรีย ที่ปริมาณ 2.4 mg/kg ถูกให้ทางการฉีดเข้าผนังช่องท้อง ก่อนและหลังการฉีดเชื้อพลาสโมเดียม โยอีไลที่ day0 หนูทุกกลุ่มจะถูกติดตาม อัตราการมีชีวิตรอด ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น และปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ด้วยการย้อมสี Giemsa และถูกตรวจนับ การทดลองพบว่า หนูกลุ่ม Py only เริ่มตายลงเหลือ 60% ในวันที่ 5 และเสียชีวิตทั้งหมดในวันที่ 7 หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระท่อมทั้ง 2 กลุ่ม เริ่มเสียชีวิตในวันที่ 6 ของการทดลอง โดยกลุ่มโดส 75 mg หนูมีอัตราการรอดชีวิตที่ 100% และที่ปริมาณ 150 mg หนูมีอัตราการรอดชีวิตที่ 60% อย่างไรก็ตามกลุ่มที่รักษาด้วยใบกระท่อม ยังพบการเพิ่มขึ้นของ %parasitemia มากกว่า 50% เมื่อเทียบกับกลุ่ม Py only ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อในเม็ดเลือดแดงของกลุ่มที่ติดเชื้อมีมากถึง 60% ในวันที่ 6 ซึ่งตรงข้ามกับกลุ่มที่ได้รับยา artesunate ที่มีการลดลงของ %parasitemia อย่างชัดเจน ในวันที่ 8 ของการทดลอง หนูทุกกลุ่มจะถูกเก็บอวัยวะเพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของตับ ด้วยการย้อมสี H&E ผลพบว่าหนูกลุ่มติดเชื้อทุกกลุ่ม ตับมีขนาดใหญ่ขึ้น มีสีน้ำตาลคล้ำ แตกต่างจากกลุ่มไม่ติดเชื้อ และเมื่อย้อม H&E ตับของกลุ่มที่ติดเชื้อทั้งหมด พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระท่อมทั้ง 2 ปริมาณ สามารถลดความเปลี่ยนแปลงของ hepatocytes ลดการขยายตัวของ sinusoids และลดปริมาณการสะสม hemozoin ใน Kupffer cell ตับได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษาเลย ผลการศึกษาดังนี้พบว่า สารสกัดจากใบกระท่อม ไม่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อมาลาเรียโดยตรงเมื่อเทียบกับยามาตรฐาน artesunate แต่สามารถช่วยเพิ่มระยะเวลาการรอดชีวิต และช่วยบรรเทาความรุนแรงของพยาธิสภาพในตับของหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรียได้ ซึ่งอาจเป็นผลจากคุณสมบัติด้านการอักเสบของใบกระท่อม แม้กระท่อมจะถูกใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก แต่ยังไม่พบการนำมาใช้ทางยาหรือทางการแพทย์อย่างเป็นทางการ ดังนั้น จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ จึงน่าสนใจที่จะนำไปต่อยอด เพื่อศึกษาค้นคว้าคุณสมบัติทางการแพทย์ของสารสกัดจากใบกระท่อมต่อไป



60312303 : Major (FORENSIC SCIENCE)

Keyword : EXTRACT KRATOM LEAF MALARIA LAB RAT.

MISS NUTTAKAN THONGSUNTUD : EFFECT OF *MITRAGYNA SPECIOSA* (*KORTH*) *HAVIL.* EXTRACT IN *PLASMODIUM YOELII* (*Py*) INFECTED MICE. THESIS ADVISOR : MUHAMMAD NIYOMDECHA

The leaves of the *Mitragyna speciosa* (*Korth*) *Havil.* (*MS*) tree, known as 'kratom' in Thailand, were originally used mainly in treating mild medical problems, fever, diarrhea, and to reduce the strain and fatigue of physical labor. However, it was used to suppress opiate withdrawal symptoms. Pharmacologically, *MS* has been shown to possess antitussive, anti-nociceptive, anti-inflammatory and antidiarrheal properties. Since the emergence of drug resistant strains of malaria parasites, the rate of resistance has been increasing and limiting adequate treatment of malaria. The aim of this study was to investigate the medicinal properties of *MS* extract, so as to provide more pharmacological evidence, whether it could show the ability to treat malaria *Plasmodium Yoelii* (*Py*) infected mice. Thirty five ICR mice were separated to 7 groups (5 each) and performed this experiment for 8 days. The ethanolic leaf extract of *MS* at doses of 75 and 150 mg/kg were prepared in cosolvent (distilled water: Tween 80: propylene glycol; 4:1:4). At day 3 after infection, the four-day suppressive, curative effects of *MS* against infection were carried out by intraorally treatment of *MS* in *Py* infected mice once a day and using Artesunate (*ART*, 2.4 mg/kg, i.p.) as a positive control, anti-malarial drug. Survival rate, % hematocrit and % parasitemia were then examined and subsequently calculated. *Py* infected mice started to die and showed decrease in survival rate at day 5 (60%) to day 7 (0%). Six days after infection, *MS* extract at a dose of 75 and 150 mg/kg exerted prolong survival rate, 100% and 60% respectively, but % parasitemia still be high and more than 50% when compared to *Py* infected mice. For histomorphological determination at day 8, livers were collected, processed and stained with hematoxylin and eosin. In *Py* infected mice, *MS* treatment could decrease changes of hepatocytes, distension of sinusoids and hemozoin accumulation in Kupffer cells. In conclusion, Kratom is now used worldwide with no medical prescription or supervision. The evidence that supports its use for clinical purposes is still required. In present study, *MS* extract showed no anti-malarial activity but it could prolong survival rate that may be further studied. However, the decreased severity of liver by *MS* extract may be mediated via its anti-inflammatory effect.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง ผลของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูเมาส์ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม โยอีไล สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับคำแนะนำ แนวทางในการดำเนินงานวิจัย และความช่วยเหลือจาก อาจารย์ ดร.มูฮัมหมัด นิยมเดชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. พ.ท.ญ. สุพิน ชมภูพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยความเมตตาอย่างยิ่งในการดำเนินงานวิจัยมาโดยตลอด งานวิจัยชิ้นนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้เลย หากไม่ได้รับความกรุณาจากท่านอาจารย์ทั้งสอง ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพรยูพา สงวนวงษ์ นักศึกษาปริญญาเอก หลักสูตรกายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่เป็นพี่เลี้ยงในการทำแล็บ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ให้การช่วยเหลือตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนถึงสิ้นสุดกระบวนการในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณสมาชิกแล็บนิวโรไซน์ทุกคน ที่ช่วยเหลือในการให้คำแนะนำในการทำแล็บ ขอขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่น นิติวิทยาศาสตร์ รุ่น 13 ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาด้วยดีมาโดยตลอด

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณนายสุวิทย์ ทองสันทัด และนางยุชยา ทองสันทัด บิดามารดา ผู้สนับสนุนข้าพเจ้าในทุก ๆ ด้าน เป็นทั้งกำลังใจและกำลังเงินตลอดระยะเวลาที่ศึกษา ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

นางสาว นุตกานต์ ทองสันทัด



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญรูปภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	4
1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย .....	4
1.4 ตัวแปรที่ศึกษา.....	4
1.5 ขอบเขตการศึกษา.....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	6
บทที่ 2 .....	7
แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 กระท่อม.....	7
2.2 ประโยชน์ทางการแพทย์ .....	8
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชกระท่อม .....	9
2.4 โรคมะลาเรีย.....	12

2.5	วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย .....	14
2.6	Mararia pigment .....	15
2.7	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้พืชกระท่อมในการรักษามาลาเรีย.....	17
บทที่ 3 .....		20
วิธีดำเนินการวิจัย.....		20
3.1	การเตรียมงานวิจัย.....	20
3.1.1	อุปกรณ์.....	20
3.1.2	สารเคมี .....	21
3.2	การเตรียมสารสกัดใบกระท่อม.....	23
3.3	ความเข้มข้นของสารสกัดใบกระท่อมที่ใช้ในการทดลอง.....	24
3.4	ยา artesunate ที่ใช้ในการทดลอง .....	25
3.5	ปริมาณเชื้อ <i>Plasmodium yoelli</i> .....	25
3.6	กลุ่มสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษา .....	27
3.7	วิธีการแบ่งกลุ่มศึกษา.....	28
3.8	ระยะเวลาของการทดลอง .....	29
3.9	การดำเนินการวิจัย .....	31
3.9.1	การป้อนสารสกัดใบกระท่อมในหนูทดลอง.....	31
3.10	การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ และการติดตามภาวะซีดของหนูทดลอง .....	32
3.10.1	การตรวจนับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ (Percent Parasitemia) .....	32
3.10.2	ตรวจเช็คปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ.....	34
3.11	การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลอง .....	36
3.11.1	การ Euthanize .....	36
3.11.2	การเก็บตัวอย่างเลือดด้วยวิธี cardiac puncture และ perfusions .....	36
3.11.3	การเก็บอวัยวะตับ .....	37

3.12 การศึกษาความเปลี่ยนแปลง ใน ดับ ของหนูทดลอง .....	38
3.12.1 ขั้นตอนการ Process อวัยวะ ดับ .....	38
3.12.2 ขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin & Eosin.....	40
3.13 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในอวัยวะ ดับ ของสัตว์ทดลอง .....	43
3.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	44
บทที่ 4 .....	45
ผลการศึกษา .....	45
4.1 อัตราการรอดชีวิต (Survival rate and time).....	45
4.2 ปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (Hematocrit).....	48
4.3 ปริมาณการติดเชื้อที่เม็ดเลือดแดง (Parasitemia).....	51
4.4 การเปลี่ยนแปลงทางลักษณะสัณฐานวิทยาของตับ (Morphology).....	57
4.5 การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาค (Histology) ของตับ.....	59
4.6 ปริมาณการสะสมของ Hemozoin ภายในตับ.....	63
บทที่ 5 .....	67
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	67
สรุปผล.....	67
อภิปรายผล .....	71
ข้อเสนอแนะ.....	71
รายการอ้างอิง .....	72
ประวัติผู้เขียน .....	79

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงชนิดสายพันธุ์หนูไมซ์ที่นำมาศึกษาผลของสารสกัดใบกระท่อมทั้งหมด 37 ตัวหนูทดลองจำนวน 2 ตัว จะถูกนำมาใช้เป็น Booster .....	27
ตารางที่ 2 แสดงการแบ่งกลุ่มหนูทดลอง การติดเชื้อมาลาเรีย Py รวมถึงชนิดของสารที่ได้รับและวิธีการให้ ในกลุ่มหนูทดลอง 7 กลุ่ม.....	28
ตารางที่ 3 แสดงอัตราการรอดชีวิตของหนูไมซ์หลังได้รับเชื้อมาลาเรีย Py ในแต่ละกลุ่ม (n=5) ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 8 (สิ้นสุดการทดลอง).....	46
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (Hematocrit) ของหนูไมซ์ ก่อนและหลังได้รับเชื้อมาลาเรีย Py ในแต่ละกลุ่ม (n=5) .....	49
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบ % Parasitemia ท่ามกลางกลุ่มหนูทดลอง แสดงข้อมูลเป็น Mean $\pm$ SEM (%) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ ANOVA ในรูปแบบของ Tukey's test พิจารณาค่าความต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value < 0.05 .....	54
ตารางที่ 6 ปริมาณการสะสมของ Hemozoin ในเนื้อเยื่อตับ (% hemozoin ต่อ 239.89 x 180.62 mm <sup>2</sup> ของพื้นที่รูปภาพ) เปรียบเทียบท่ามกลางกลุ่มหนูทดลองที่ปกติกับกลุ่มหนูที่ติดเชื้อมาลาเรีย Py และกลุ่มที่ได้รับการรักษา แสดงข้อมูลเป็น Mean $\pm$ SEM (%) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ ANOVA ในรูปแบบของ Tukey's test พิจารณาค่าความต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value < 0.05.....	65

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 ใบกระท่อม .....	8
รูปภาพที่ 2 แสดงตัวอย่างโครงสร้างอัลคาลอยด์ที่พบในใบกระท่อม .....	12
รูปภาพที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในระยะต่าง ๆ .....	16
รูปภาพที่ 4 การ stirred สารตัวอย่างกับตัวทำละลายเอทานอล .....	23
รูปภาพที่ 5 กรองลดความดันสารที่ได้.....	23
รูปภาพที่ 6 ระเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator.....	24
รูปภาพที่ 7 การ Booster ของ stock เชื้อพลาสโมเดียมในหนูทดลอง .....	26
รูปภาพที่ 8 แสดงช่วงระยะเวลาในการทดลอง.....	30
รูปภาพที่ 9 เข็มป้อนสารสัตว์ทดลองขนาด 18 นิ้ว .....	32
รูปภาพที่ 10 ตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ถูกติดเชื้อมาด้วยโปรแกรม Image J.....	34
รูปภาพที่ 11 สูตรคำนวณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ .....	35
รูปภาพที่ 12 แผนผังที่ การ Perfusion .....	37
รูปภาพที่ 13 ผังการย้อมสี Harris's hematoxylin & eosin .....	42
รูปภาพที่ 14 การวิเคราะห์ค่า hemozoin ตับโดยใช้ซอฟต์แวร์ ImageJ พื้นที่ % (กรอบสีแดง) แสดง ค่าเฉลี่ยของ hemozoin ในภาพถ่ายต่อพื้นที่ 239.89 x 180.62 mm <sup>2</sup> โดย % hemozoin คำนวณจาก ภาพถ่าย 5 ภาพ ต่อหนู 1 ตัว และนำมาวิเคราะห์หา% hemozoin เฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม .....	43
รูปภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิต และเวลาการรอดชีวิตของหนูในแต่ละกลุ่มของการ ทดลอง.....	47
รูปภาพที่ 16 แผนภูมิแสดงปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (Hematocrit) ของหนูไม่ซ้ ก่อน และหลังได้รับเชื้อมาลาเรีย Py ในแต่ละกลุ่ม .....	50
รูปภาพที่ 17 ภาพแสดงรูปถ่าย Thin blood smear จากหนูที่ได้รับเชื้อ Py ถ่ายภาพภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยสัญลักษณ์ Normal Red Blood Cell (nRBC) คือ เม็ดเลือดแดง	

ปกติ, และแสดงสัญลักษณ์ระยะการเติบโตของเชื้อปรสิต Py ตามลำดับดังนี้ ระยะ Ring (R) stage, ระยะ Trophozoite (T) stage, และระยะ Schizont (S) stage เชื้อมาลาเรีย Py ใช้ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงเพื่อการเจริญเติบโต .....52

รูปภาพที่ 18 ภาพถ่ายThin blood smear ของหนูในแต่ละกลุ่ม ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ ในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อ ที่กำลังขยาย 100 เท่า มาตรฐาน 20  $\mu$ m .....53

รูปภาพที่ 19 กราฟแผนภูมิ %parasitemia เปรียบเทียบท่ามกลางกลุ่มหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรีย Py ทั้งหมด 4 กลุ่ม แสดงข้อมูลเป็น Mean  $\pm$  SEM (%) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ ANOVA ในรูปแบบของ Tukey's test พิจารณาค่าความต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value < 0.0556

รูปภาพที่ 20 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตับเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม .....58

รูปภาพที่ 21 เปรียบเทียบจุลพยาธิวิทยาของตับในกลุ่ม Sham และกลุ่ม Py โดยการย้อมสี H&E ...60

รูปภาพที่ 22 เปรียบเทียบจุลพยาธิวิทยาของตับในกลุ่ม Sham, Sh-MS75 และ Sh-MS150 โดยการย้อมสี H&E .....61

รูปภาพที่ 23 เปรียบเทียบจุลพยาธิวิทยาของตับในกลุ่มที่ได้รับการรักษา เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา ได้แก่กลุ่ม Py-ART, Py-MS75 และ Py-MS150 โดยการย้อมสี H&E .....62

รูปภาพที่ 24 เปรียบเทียบ hemozoin ที่สะสมในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มที่ติดเชื้อ Py ได้แก่ Py, Py-ART, Py-MS75 และ Py-MS150 (ลูกศรสามเหลี่ยมสีแดง): เม็ดสี hemozoin.....64

รูปภาพที่ 25 กราฟแสดงข้อมูล % hemozoinในตับ (percentage /239.89 x 180.62 mm<sup>2</sup> area) ซึ่งสัมพันธ์กับผลของกลุ่ม Py จากนั้นเปรียบเทียบระหว่าง 7 กลุ่มของการทดลอง .....66

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

กระท่อม เดิมถูกจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มพืชเสพติด ตามข้อกำหนดใน พรบ.ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ในฐานะยาเสพติดให้โทษประเภท 5<sup>(1)</sup> เมื่อเสพเข้าไปจะมีอาการมึนเมา พบการใช้กระท่อมมากในกลุ่มวัยรุ่น ใช้เพื่อความสนุกสนาน โดยรู้จักกันในชื่อ 4x100 คือการนำไปกระท่อมไปผสมกับสารอื่นตามที่อยากจะให้มีฤทธิ์ตามที่ต้องการ<sup>(2)</sup> ปัจจุบัน กระท่อมถูกปลดจากยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตาม พรบ. ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2564 (ฉบับที่ 8) เนื่องจากในหลายประเทศพืชกระท่อมไม่ได้ถูกกำหนดให้เป็นยาเสพติดให้โทษ ดังนั้น เพื่อให้สอดคล้องกับหลักสากลและบริบทของสังคมไทย ที่ในบางพื้นที่มีการบริโภคพืชกระท่อมตามวิถีชาวบ้าน จึงยกเลิกพืชกระท่อมจากการเป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 5

ปัจจุบันในประเทศไทย พบปัญหาการก่ออาชญากรรมที่มีสาเหตุจากการใช้สารเสพติดอย่างต่อเนื่องปรากฏในสื่อสังคมออนไลน์ เนื่องจากสารเสพติดมีราคาถูกและจัดหาได้ง่าย ไม่ว่าจะเป็นยาบ้า ยาไอซ์ โคลเคน กัญชา หรือแม้แต่กระท่อม ที่ถูกปลดจากการเป็นสารเสพติดประเภทที่ 5 ทำให้การซื้อหาเสพติดทำได้ง่ายยิ่งขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มวัยรุ่นที่มีความอยากรู้อยากลองถึงคุณสมบัติการมึนเมาของการเสพกระท่อม ก็สามารถซื้อหาได้โดยไม่ผิดกฎหมาย และยังมีการนำกระท่อมมาใช้เสพได้หลากหลายวิธี โดยเรียนรู้ผ่านช่องทางออนไลน์ ไม่ว่าจะเป็น Facebook, YouTube, Twitter หรือช่องทางอื่น ๆ<sup>(3)</sup> ซึ่งอาจเป็นสาเหตุนำไปสู่การใช้สารเสพติดอื่น ๆ ที่มีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อกระท่อมถูกปลดจากการเป็นสารเสพติดประเภทที่ 5 แล้ว จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาพิสูจน์ถึงคุณสมบัติของกระท่อมในด้านอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากการเป็นสารเสพติด โดยเฉพาะในทางการแพทย์ พบว่าในต่างประเทศมีการศึกษาการใช้กระท่อมในทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย แต่ในประเทศไทยเอง เนื่องจากในอดีตกระท่อมจัดอยู่ในกลุ่มวัตถุผิดกฎหมาย จึงเป็นอุปสรรคต่อการนำมาศึกษา ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติของกระท่อมในประเทศไทยจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

ในกระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์ การพิสูจน์หลักฐานมีความสำคัญต่อรูปคดี โดยนิติวิทยาศาสตร์ เป็นวิชาที่ว่าด้วยการนำหลักวิทยาศาสตร์สาขาต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาทางกฎหมาย และพิสูจน์ข้อเท็จจริงเกี่ยวกับคดีความ โดยจำแนกตามประเภทของวิทยาศาสตร์ ได้แก่



นิติวิทยาศาสตร์ที่เป็นวิทยาศาสตร์ธรรมชาติ และ นิติวิทยาศาสตร์ที่เป็นวิทยาศาสตร์ประยุกต์<sup>(4)</sup> ในงานวิจัยฉบับนี้ ได้นำนิติวิทยาศาสตร์ในสาขา นิติพยาธิวิทยา (Forensic Pathology) และ นิติเภสัชวิทยา (Forensic Pharmacology) มาใช้ เพื่อพิสูจน์คุณสมบัติของกระท่อมที่นอกเหนือจากการเป็นสารเสพติด โดยการศึกษาการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

กระท่อม สร้างสารเคมีในกลุ่มแอลคาลอยด์หลายชนิด สารเคมีในกระท่อมที่นักวิจัยให้ความสำคัญ คือ สารไมทราไจนีน เนื่องจากมีสรรพคุณในการรักษาอาการปวด<sup>(2)</sup>

สารไมทราไจนีน มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีขาว ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และละลายได้ดีในกรด<sup>(5)</sup> ในปี ค.ศ. 2010 มีรายงานความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารไมทราไจนีนกับฤทธิ์ลดความเจ็บปวด โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยการเปลี่ยนหมู่แทนที่ ส่งผลให้คุณสมบัติของการเป็นยาแก้ปวดลดลงหรือหมดไป<sup>(6)</sup> เมื่อนำมาทดลองในหนูทดลอง พบว่า สารสกัดไมทราไจนีน ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยเฉพาะสมอง ทำให้พฤติกรรมการกินอาหารของหนูทดลองลดลงอย่างเห็นได้ชัด<sup>(7)</sup> นอกจากนี้ สารสกัดจากใบกระท่อม ยังกระตุ้นเซลล์ประสาทบริเวณก้านสมอง ส่งผลต่อสารสื่อประสาทซีโรโทนิน<sup>(8)</sup> ซึ่งสารชนิดนี้ ควบคุมการหลับ-ตื่น ให้เป็นปกติ หากสารนี้หลังในปริมาณที่น้อยลง จะส่งผลในด้านพฤติกรรมและอารมณ์

อย่างไรก็ตาม ดังที่กล่าวมาข้างต้นแม้พืชกระท่อมจะถูกปลดจากการเป็นสารเสพติด แต่เนื่องจากมีรายงานผลของการใช้กระท่อมต่อระบบประสาท มีผลต่อกระบวนการคิดและพฤติกรรม การแสดงออกหลังการใช้/หรือหยุดใช้ เช่น ในประเทศมาเลเซียมีรายงานว่า กระท่อมนิยมใช้ในกลุ่มผู้ที่ติดสารเสพติด เนื่องจากหาได้ง่ายและราคาถูกกว่าสารเสพติดชนิดอื่น ทำให้ผู้ใช้ติดและหา มาเสพเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ<sup>(9)</sup> ส่วนในประเทศไทยผู้ใช้กระท่อม มักนำไปกระท่อมไปต้มผสมกับยาแก้ ไอ น้ำค้ำ ยาแก้ปวด น้ำอัดลม และใส่หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ เพื่อให้มีฤทธิ์มีนเมาอย่างรุนแรง ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ 4x100(10) หลังพืชกระท่อมถูกปลดออก จะพบเห็นประชาชนนำใบกระท่อมมา วางจำหน่ายอย่างคึกคัก กลุ่มผู้เสพยากระท่อมหาซื้อได้ง่ายขึ้น และสามารถเสพยาได้อย่างอิสระ ทำให้ผู้วิจัย สนใจที่จะนำสารสกัดจากใบกระท่อม มาทำการศึกษาในหนูทดลอง เพื่อศึกษาผลของการ ใช้สารสกัดจากใบกระท่อมในทางการแพทย์ โดยใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของกระท่อมในการ รักษาโรคมalariaเรื้อรังในหนู

เนื่องจากโรคมalariaเรื้อรัง ไข้จับสั่น หรือไข้ป่า (Malaria) เป็นโรคติดเชื้อโปรโตซัวในกลุ่มพลาสโมเดียม (*Plasmodium spp.*) ติดต่อสู่คนโดยการกัดของยุงก้นปล่อง (*Anopheles spp.*) เป็นโรคสำคัญที่ยังพบการระบาดในพื้นที่ประเทศไทยที่มีเขตติดต่อกับเพื่อนบ้าน นอกจากนี้พื้นที่ดังกล่าว ยังพบว่ามีกรปลูกกระท่อมหรือเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของพืชกระท่อม โดยโรคไข้มาลาเรีย



เคยมีรายงานการติดเชื้อจากคนสู่คน ผ่านทางการรับเลือด การปลูกถ่ายอวัยวะ และจากมารดาสู่ทารกในครรภ์แต่น้อยมาก โรคไข้มาลาเรียพบมากในภูมิภาคเขตร้อนชื้นและมักพบการระบาดมากในช่วงฤดูฝน ซึ่งยุงก้นปล่องจะวางไข่ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติโดยเฉพาะบริเวณที่อากาศอบอุ่น ไข่จะฟักเป็นลูกน้ำภายใน 2 – 3 วัน และมีระยะเวลาในการเป็นลูกน้ำอีก 9 – 12 วันก่อนที่จะกลายเป็นยุงตัวเต็มวัย โดยยุงตัวเมียเท่านั้นที่ดูดเลือดคนและสัตว์ และสามารถนำเชื้อมาลาเรียได้ ผู้ที่รับเชื้อมาลาเรียไปแล้ว ส่วนใหญ่จะมีระยะฟักตัวของโรคประมาณ 10 – 14 วัน หรืออาจยาวนานกว่านั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อพลาสโมเดียมที่ได้รับ อาการสำคัญของโรคไข้มาลาเรีย คือ ไข้ หนาวสั่น ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ บางรายที่อาการรุนแรงอาจมีภาวะแทรกซ้อนเช่น ตับวาย ไตวาย ไข้มาลาเรียขึ้นสมอง ทำให้เสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องอย่างทันท่วงที<sup>(11)</sup> แม้ว่ารายงานการติดเชื้อและอัตราการตายของผู้ป่วยจากโรคมาลาเรียจะมีแนวโน้มลดลงทุกปี แต่ปัจจุบัน ยังไม่พบรายงานการใช้วัคซีนหรือยาที่ใช้จำเพาะเพื่อป้องกันรักษาโรคมาลาเรียเช่นกัน

หากพบว่ากระท่อมมีคุณสมบัติในการต้านมาลาเรีย จะเป็นประโยชน์ต่อชาวบ้านในพื้นที่เป็นอย่างยิ่งในการนำกระท่อมมาใช้ในการรักษา เนื่องจากกระท่อมนั้นมีราคาถูกและหาได้ง่ายในปัจจุบัน นอกจากนั้นจะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์สร้างชื่อเสียงให้กับประเทศไทย ในการค้นพบยาต้านมาลาเรียชนิดใหม่อีกด้วย

*Plasmodium yoelii* XL (Py) เป็นเชื้อปรสิตก่อโรคมาลาเรียในหนู และมีความนิยมนำมา เป็นต้นแบบในการศึกษาความรุนแรงของโรคมาลาเรียมีหลายการศึกษาพบว่าเชื้อ Py มีการชักนำให้เกิดโปรตีนกระตุ้นการอักเสบในปริมาณที่มากขึ้น รวมถึงกลไกการเกาะรวมกันของ pRBCs ในหลอดเลือดและเซลล์อื่น ๆ เช่นเดียวกับเชื้อที่ก่อโรคในคน<sup>(12)</sup> ส่งผลให้มีการดำเนินของพยาธิสภาพที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ ดังนั้นเชื้อ Py ชนิดนี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เพื่อให้หนูทดลองได้รับสารสกัดใบกระท่อมในปริมาณที่แน่นอน ผู้วิจัยจึงให้สารสกัด ด้วยวิธี gavage ตั้งแต่วันที่ 3-7 จากนั้นจะนำอวัยวะที่เกี่ยวข้อง เช่น ตับ มาศึกษาพยาธิสภาพ โดยอาศัยหลักการ การผ่าทางนิติพยาธิวิทยา คือ เริ่มตั้งแต่การตรวจสภาพภายนอก ตรวจบาดแผล และการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของร่างกายภายนอก แล้วจึงผ่าเพื่อตรวจภายใน เพื่อหาสาเหตุการตาย กลไกในการตาย และในบางราย อาจจะช่วยเป็นแนวทางให้ทราบถึงพฤติการณ์ในการตายได้<sup>(13)</sup> เพื่อให้ทราบรายละเอียด และข้อมูลตามต้องการ โดยในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาถึงความผิดปกติภายใน เช่น ความผิดปกติของตับ ในหนูไม่ซ้ ใช้วิธีตรวจดูทางจุลกายวิภาคศาสตร์ จากการตัด section พาราฟิน บล็อก ย้อมสี H&E นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิเคราะห์ผล

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมยออีไล (*Plasmodium yoelii* XL (Py))

## 1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย

สารสกัดจากใบกระท่อมน่าจะไม่มีความเป็นพิษต่อหนูทดลองที่ปกติ และมีประสิทธิภาพที่สามารถต้านเชื้อมาลาเรียและสามารถบรรเทาความรุนแรงต่ออวัยวะตับของหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมยออีไลได้

## 1.4 ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น สารสกัดจากใบกระท่อม

ตัวแปรตาม หนูไมซ์ที่ได้รับการรักษา

ตัวแปรควบคุม เชื้อ *Plasmodium yoelii* XL (Py)

## 1.5 ขอบเขตการศึกษา

1.5.1 สกัดใบกระท่อมเพื่อการศึกษา โดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ภายใต้การดูแลของ อาจารย์ ดร. มุฮัมหมัด นิยมเดชา โดยมีผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องอาทิ

การศึกษา	ผู้เขียน
การแยกเมทแอมเฟตามีนกับไดเมทิลแอมเฟตามีนในตัวอย่างยาบ้าด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และวิธี Gas Chromatography (GC)	ศิริกัญญา เรืองศรี, 2552
การวิเคราะห์หาปริมาณสารเมทแอมเฟตามีนในยาเสพติดด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography และโปรแกรม	วรรณิศา กลิ่นจันทร์, 2555

วิเคราะห์ภาพ	
การหาปริมาณไมทราไจนินในใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย	นราพงศ์ บุรุมรา, 2554
การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนินเพื่องานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากกระท่อม	กิตติศักดิ์ เหมือนดาว, 2561
การแยกและการหาปริมาณไมทราไจนินในใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี	โอภาส กุรีวรรณ, 2560
การทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณต่ำสุดของไมทราไจนินด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง	ภัทรธิดาพร มุ่งเครือ, 2561

1.5.2 ตรวจสอบพืชกระท่อมเบื้องต้น ด้วยการตรวจเอกลักษณ์ของพืชกระท่อม ควบคุมการทดลองโดยใช้พืชกระท่อมจากแหล่งเดียวกัน

1.5.3 ใช้ยาต้านมาลาเรีย Artesunate 2.4 mg/kg เพื่อเปรียบเทียบผลผลด้านการต้านเชื้อมาลาเรีย

1.5.4 หนูไมซ์ จำนวน 7 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว สั่งซื้อจากบริษัท โนมูระสยามอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด โดยนำมาทำการทดลองที่ศูนย์สัตว์ทดลองคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

1.5.5 เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ทดลองผู้วิจัย U1-05992-2559 และดำเนินการขออนุมัติทำการทดลองในสัตว์ (Ethic) SiACUP No. 010/2559

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สารสกัดจากใบกระท่อมไม่มีความเป็นพิษต่อหนูทดลองที่ปกติ นอกจากนั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ด้านการต้านเชื้อมาลาเรีย บรรเทาความรุนแรงที่เกิดขึ้นในอวัยวะและชะลอการตายในหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium yoelii* XL (Py) ได้

## 1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

สารสกัดจากใบกระท่อม หมายถึง สารสกัดหยาบที่ประกอบไปด้วยสารแอลคาลอยด์ทั้งหมดที่มีอยู่ในใบกระท่อม โดยมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ในกลุ่มแอลคาลอยด์หลายชนิด เช่น mitragynine (60-65%) paynantheine (9%) speciogynine (7%) และ 7-hydroxymitragynine (2%) เป็นต้น

มาลาเรีย หมายถึง โรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในกลุ่มพลาสโมเดียม (*Plasmodium spp.*) โดยมียุงก้นปล่อง (*Anopheles spp.*) เป็นพาหะ มีระยะฟักตัวโดยทั่วไปประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ มีอาการเริ่มต้นที่ไม่จำเพาะ อาการที่พบได้บ่อยที่สุดคือ ไข้ ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ไม่มีเรี่ยวแรง ไม่สบายในท้อง (ปวดท้อง) ปวดกล้ามเนื้อและข้อ ร่วมกับไข้หนาวสั่น เหงื่อออก เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ไอ ซีด ตับ ม้ามโต โรคนี้สามารถหายขาดได้ หากให้การวินิจฉัยและรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็ว หากไม่ได้รับการรักษาหรือได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสม โรคนี้สามารถดำเนินไปสู่ระยะรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะไข้โรคมมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

หนูทดลอง หมายถึง หนูที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการทดลองวิทยาศาสตร์เท่านั้น ภายใต้ข้อกำหนดมาตรฐานและจรรยาบรรณวิชาชีพ โดยใช้หนูจำนวนน้อยที่สุดและต้องแน่ใจว่าการกระทำใด ๆ กับหนูไม่ใช่การทารุณกรรม หากจะต้องเสียชีวิตของหนูแต่ละตัวจะต้องมอบคุณประโยชน์สูงสุดต่อมนุษย์ รวมถึงสัตว์อื่น ๆ

## บทที่ 2

### แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กระท่อม

พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.) เป็นไม้ยืนต้นพืชถิ่นวงศ์เดียวกับกาแฟ มีชื่อเรียกหลายชื่อ ทางใต้เรียก ท่อม (thom) ภาคกลางเรียก อีถ่าง มาเลย์เรียก เบ็ยะ (biak) หรือ เคอ ตุ่ม (ketum) หรือ เซบัท (sepat) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ความสูง 15-30 เมตร ลักษณะใบเป็นใบ เดี่ยว รูปไข่ ปลายใบแหลม โคนใบป้าน เรียงเป็นคู่ตรงกันข้าม ขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบลื่น แผ่นใบ บาง (รูปที่ 1) ด้านท้องใบมีเส้นใบเป็นสันเห็นได้ชัดเจน มีเส้นแขนงใบ ช้างละประมาณ 10-15 เส้น ขนาดใบแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ก้านใบยาว 3-5 เซนติเมตร ยอดอ่อนเห็นหูใบรูปใบหอกอยู่ตรง กลางระหว่างกันใบอ่อนทั้งสองข้างจำนวน 1 คู่ เส้นบริเวณท้องใบเป็นสัน เส้นใบเป็นสีแดง เรียก ชนิดก้านแดง และเส้นใบเป็นสีเขียว เรียก ชนิดก้านเขียว บางชนิดอาจมีปลายใบเป็นหยัก เรียก ชนิด หางกิ้ง หรือ หยักใหญ่ ช่อดอกเป็นกระจุกแน่นทรงกลม ออกจากปลายกิ่ง ประมาณ 1-3 ช่อ ก้านช่อดอกยาว 7-12 เซนติเมตร แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยประมาณ 70-80 ดอก เมื่อแรกบานมีสีขาว นวลแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ เป็นชนิดดอกสมบูรณ์เพศ ลักษณะผลกลุ่มอัดแน่น เป็นรูปทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 เซนติเมตร ภายในผลย่อย มีเมล็ดประมาณ 140-160 เมล็ด และมีปีกบาง ๆ สามารถปลิวไปได้ไกล พบในบริเวณแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย มาเลเซีย เมียนมาร์ ลาว กัมพูชา อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และเกาะนิวกินี พืชกระท่อมเติบโตได้ดีในบริเวณป่าดิบชื้น ริมลำธาร ซึ่งในประเทศไทย จะพบได้มากในภาคใต้ โดยชาวบ้านปลูกใน บริเวณไร่บ้าน ในร่องสวนหรือทุ่งนา และสามารถพบได้ในป่าธรรมชาติ ในภาคกลาง พบใน จังหวัดปทุมธานี และอยุธยา เป็นต้น<sup>(2)</sup> ซึ่งชาวบ้านมักจะนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร ที่ใช้ในการรักษา โรคท้องเสีย ใช้เคี้ยวเพื่อกระตุ้นให้สามารถทำงานให้ทนนานมากขึ้น ใช้ในการสังสรรค์กับเพื่อน นำไปใช้ในการสร้างความสัมพันธ์ของผู้คนในสังคม รวมถึงนำไปใช้ทดแทนสารเสพติด นำไปผสมกับยาตัวอื่นเพื่อให้เกิดความมึนเมา คึกคะนอง สนุกสนาน แต่อย่างไรก็ตาม กระท่อมยังมีสรรพคุณอื่นที่นักวิจัยให้ความสำคัญในการศึกษาวิจัยนำไปใช้ในทางการแพทย์

## ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

อาณาจักร : Plantae

วงศ์ : Rubiaceae

สกุล : *Mitragyna*

สปีชีส์ : *Mitragyna speciosa* Korth.



รูปภาพที่ 1 ใบกระท่อม

ที่มา <https://www.thailandplus.tv/wp-content/uploads/2021/02/> สืบค้นเมื่อวันที่ 7 กุมภาพันธ์ 2565

## 2.2 ประโยชน์ทางการแพทย์

การแพทย์แผนไทยและแพทย์พื้นบ้านใช้เป็นยารักษาโรคมานาน ปรากฏในคัมภีร์แพทย์แผนโบราณของขุน ไสภาคบวรรณลักษณ์ เล่ม 1-3, ตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์, ตำราเวช



ศึกษาของพระยาพิศณุประสาทเวช และจารึกตำรายาวัชรราชโอรสารามวรวิหาร<sup>(14)</sup> นำมาใช้รักษา ไข้หวัด อาการท้องเสีย แก้ปวดเมื่อย ลดความดันโลหิต และรักษาโรคเบาหวาน ในต่างประเทศ ใช้ กระเทียมในการรักษาไข้มาลาเรีย<sup>(15)</sup> บรรเทาอาการหอบหืด ถ่ายพยาธิ รักษาโรคกระเพาะอาหาร เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ช่วยให้หลับง่าย และถอนอาการติดฝิ่น<sup>(2)</sup>

## 2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชกระเทียม

กระเทียม สรรพคุณในเภสัชกรรมในกลุ่มแอลคาลอยด์มากกว่า 40 ชนิด<sup>(16)</sup> สารเคมีในกระเทียมที่ นักวิจัยให้ความสำคัญมากที่สุด คือ สารไมทราไจนิน เป็นสารแอลคาลอยด์ที่พบมากที่สุดในกระเทียม ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1921 เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ สามารถสกัดด้วยสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น แอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และละลายได้ดีในกรด<sup>(5)</sup> กลั่นที่อุณหภูมิ 230-240 °C ที่ความดัน 5 มม.ปรอท ได้สารที่เป็นเกล็ดสีขาว<sup>(17)</sup> ในปี ค.ศ. 2010 มีรายงานความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารไมทราไจนินกับฤทธิ์ลดความเจ็บปวด โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยการเปลี่ยนหมู่แทนที่ ส่งผลให้ คุณสมบัติของการเป็นยาแก้ปวดลดลงหรือหมดไป<sup>(6)</sup> ไมทราไจนินมีฤทธิ์ระงับปวด โดยออกฤทธิ์ คล้ายมอร์ฟีน และในกลุ่มแอลคาลอยด์ในใบกระเทียม ยังมีสาร 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนิน (7-hydroxymitragynine) ซึ่งมีฤทธิ์ระงับปวดดีกว่าไมทราไจนิน และ มอร์ฟีน<sup>(18)</sup> ปัจจุบันมีความ พยายามสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างคล้ายกับ 7-hydroxymitragynine เช่น MGM-9 ซึ่งเมื่อทำการ ทดสอบพบว่ามีฤทธิ์ลดปวดได้แรงกว่า 7-hydroxymitragynine ไม่ว่าจะป้อนทางปากหรือฉีดเข้า subcutaneous<sup>(19),(20)</sup>

นอกจากสารกลุ่มแอลคาลอยด์ พืชกระเทียมยังพบสารประกอบกลุ่มอื่น เช่น กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids), เทอเพนอยด์ (terpenoids), ซาโปนิน (saponins), โพลีฟีนอล (polyphenols), แทนนิน (tannins), และไกลโคไซด์ (glycosides)<sup>(21),(22)</sup>

เมื่อนำมาทดลองในหนูทดลอง พบว่า สารสกัดจากใบกระเทียม ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ส่วนกลาง โดยเฉพาะสมอง ทำให้พฤติกรรมการกินอาหารของหนูทดลองลดลงอย่างเห็นได้ชัด<sup>(7)</sup> นอกจากนั้นสารสกัดจากใบกระเทียม ยังกระตุ้นเซลล์ประสาทบริเวณก้านสมอง ส่งผลต่อสารสื่อประสาทซีโรโทนิน<sup>(8)</sup> ซึ่งสารชนิดนี้ ควบคุมการหลับ-ตื่น ให้เป็นปกติ หากสารนี้หลังในปริมาณที่ น้อยลง จะส่งผลในด้านพฤติกรรมและอารมณ์ มีฤทธิ์คล้ายคลึงกับยาต้านซึมเศร้า

ในตำรับแพทย์แผนโบราณมีการใช้พืชกระท่อมในสูตรตำรับเพื่อรักษาโรคบิด ชาวบ้าน จะเคี้ยวใบกระท่อมเพื่อลดอาการท้องเสีย ซึ่งสารไมทราจินีนในใบกระท่อม ช่วยลดการหดตัวของ ลำไส้เล็กส่วนต้น ลดการเคลื่อนที่ของอาหารในลำไส้เล็ก มีผลลดอาการท้องเสียได้ดีใกล้เคียงกับยา มาตรฐาน แต่เมื่อให้สารสกัดใบกระท่อมเป็นประจำติดต่อกันทุกวัน นาน 15 วัน ถึง 30 วัน พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของอาหารในลำไส้เล็กไม่ลดลง<sup>(23)</sup> แสดงว่าเมื่อมีการให้สารสกัดใบกระท่อมเป็น ระยะเวลาาน ระบบทางเดินอาหารจะมีการปรับตัวหรืออาจเกิดภาวะทนต่อยา

ในการศึกษาผลของไมทราจินีนต่อพฤติกรรมและระบบความจำของหนูแรทและหนูไมซ์ โดยใช้โมเดลการทดสอบพฤติกรรมและความจำ พบว่า การใช้ไมทราจินีนขนาด 1 มก./กก. ส่งผล ให้เพิ่มการเคลื่อนไหว ส่วนในขนาดปานกลางและสูง (10 และ 30 มก./กก.) ส่งผลลดการ เคลื่อนไหวของหนูทดลอง การทดสอบความวิตกกังวล พบว่าไมทราจินีนทั้งขนาดต่ำและขนาดสูง ส่งผลต่อความวิตกกังวลของหนูแรท พบอาการวิตกกังวลเพิ่มขึ้นหลังหยุดยา 24 ชม. และหายไป หลังหยุดยาครบ 72 ชม. การทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ หลังฉีดสารไมทราจินีนเข้า ทางช่องท้องเป็นเวลา 28 วัน พบว่าการเรียนรู้และความจำของหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญ<sup>(24)</sup>

ในการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน พบว่า ขนาดของสารสกัดเมทานอลจากใบ กระท่อม และสารสกัดแอลคาลอยด์ (crude alkaloids) ที่สามารถทำให้สัตว์ทดลองตาย 50% (LD50) คือขนาด 4.90 กรัม/กิโลกรัม และ 173.20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ<sup>(25)</sup> เมื่อให้สารสกัดเมทา นอลจากใบกระท่อมในขนาดที่สูง จะส่งผลให้ความดันเลือดสูงขึ้นใน 1 ชั่วโมงแรกหลังจากการให้ สารสกัด นอกจากนั้น ยังส่งผลให้ค่าเอนไซม์ในตับ alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), ไตรกลีเซอไรด์ และโคเลสเตอรอล สูงขึ้น และเมื่อให้ขนาดสูงถึง 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะทำให้ค่าครีเอตินิน (creatinine) สูงขึ้น จนอาจเป็นพิษต่อไต แต่ไม่ส่งผลต่อ น้ำหนักตัว ปริมาณอาหารและน้ำที่บริโภค หรือ ค่าอื่น ๆ ทางโลหิตวิทยา<sup>(26)</sup>

ในการศึกษาผลของสารสกัดจากกระท่อมต่อรูปแบบคลื่นไฟฟ้าสมองและการนอนหลับใน สัตว์ทดลอง โดยทำการผ่าตัดฝังขั้วไฟฟ้าในสมองสัตว์ทดลองบริเวณ ฟรอนทอล (frontal) และพา ไรเอทอล (parietal) เพื่อบันทึกคลื่นไฟฟ้าสมองจากทั้ง 2 บริเวณ และทำการบันทึกคลื่นไฟฟ้า กกล้ามเนื้อ (electromyography: EMG) เพื่อศึกษารูปแบบการนอนหลับเปรียบเทียบกับยา มาตรฐานฟลูออกซีทีน (fluoxetine) ที่ใช้รักษาอาการซึมเศร้า โดยใช้กระท่อมขนาด 60 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม พบว่าผลของสารสกัดจากกระท่อมให้ผลคล้ายกับการได้รับยาฟลูออกซีทีน โดยมีผลเพิ่ม



ระดับของสารสื่อประสาทซีโรโทนิน (serotonin) ในสมองให้สูงกว่าปกติ มีรูปแบบคลื่นไฟฟ้าสมองคล้ายคลึงกัน ดังนั้นพืชกระท่อมจึงอาจมีฤทธิ์ด้านซึมเศร้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับสารสื่อประสาทซีโรโทนินในสมอง<sup>(27)</sup>

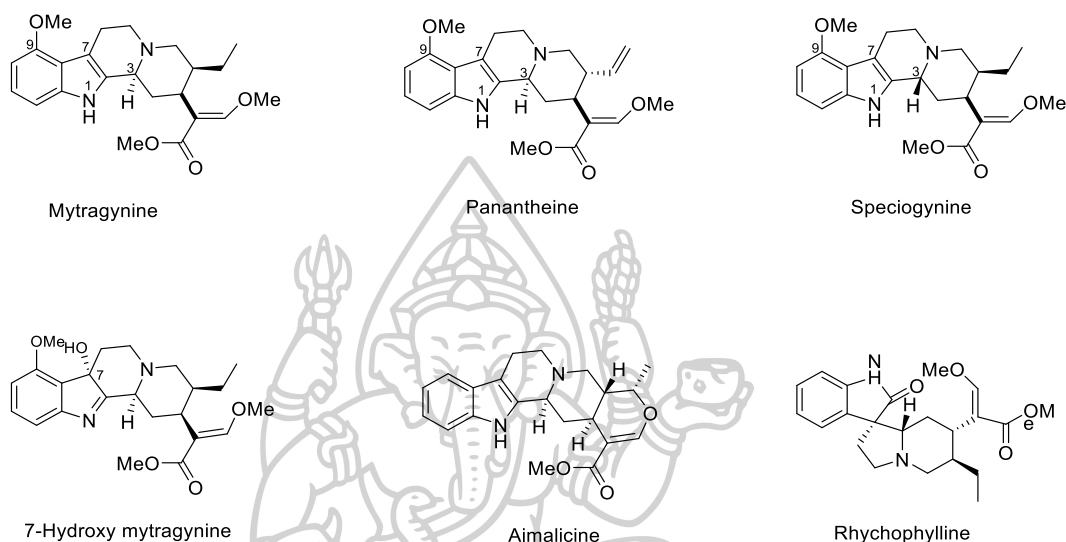
สารไมทราจินีน เมื่อเข้าสู่ร่างกายทางปาก จะเกิดการขนส่งยาเข้าสู่กระแสเลือดและระบบน้ำเหลืองผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยกระบวนการ passive transport เมื่อให้ไมทราจินีนทางหลอดเลือดดำ ขนาด 1.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมแก่หนูขาว พบว่าระดับสารไมทราจินีนสูงสุดในเลือด (Cmax) เท่ากับ 2.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 2.9 ชั่วโมง มีค่าการกระจายตัวของยา (Vz/F) เท่ากับ 0.79 ลิตร/กิโลกรัม แสดงว่าสารไมทราจินีนกระจายตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อได้น้อย ในขณะที่ให้ทางปากในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมแก่หนูขาว ใช้เวลาที่ระดับยาขึ้นสูงสุดในเลือด 1.2-1.83 ชั่วโมง<sup>(28),(29)</sup>

ในการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของพืชกระท่อมในมนุษย์<sup>(30)</sup> โดยดื่มใบกระท่อมให้ผู้สเปซติดกระท่อมเรื้อรังเป็นเวลา 8 วัน พบว่า ระดับยาสูงสุดในเลือด คือ 0.83 ชั่วโมง มีค่าครึ่งชีวิตที่ 23.24 ชั่วโมง ค่าการกระจายตัวของสารเท่ากับ 38.04 ลิตร/กิโลกรัม ค่าการกำจัดยา (Cl/F) เท่ากับ  $98.1 \pm 51.34$  ลิตร/ชั่วโมง/กิโลกรัม และการขับออกของมีทรากัยนีนทางปัสสาวะเท่ากับ 0.14% และมีรายงานการศึกษาวิจัยของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์<sup>(31)</sup> ทำการทดลองในอาสาสมัครสุขภาพดี 18 คน โดยให้น้ำดื่มใบกระท่อมปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณไมทราจินีนเฉลี่ย  $46.20 \pm 3.57$  มิลลิกรัมทางปาก พบว่าระดับยาสูงสุดในเลือดคือ  $74.94 \pm 31.9$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา  $0.87 \pm 0.33$  ชั่วโมง ค่าการกำจัดยาทั้งหมดออกนอกร่างกายเท่ากับ  $3.33 \pm 2.13$  ลิตร/ชั่วโมง/กิโลกรัม และมีปริมาตรการกระจายตัวของยาเท่ากับ  $69.82 \pm 30.01$  ลิตร/กิโลกรัม

แม้ในอดีตกระท่อมจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มพืชยาเสพติด แต่ด้วยสรรพคุณที่มีในการนำไปใช้รักษาเป็นพืชสมุนไพรตามภูมิปัญญาชาวบ้านนั้น ได้ทำให้มีผู้นำไปวิจัยอย่างแพร่หลาย ถึงประโยชน์และสรรพคุณต่าง ๆ ของใบกระท่อมดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ในประเทศไทยเองก็มีการศึกษาวิจัยในกระท่อมที่น่าสนใจ เช่น

ในงานวิจัยของวันทนาและคณะ<sup>(25)</sup> ที่ได้ทำการศึกษา ผลของสารสกัดจากใบกระท่อมต่อฤทธิ์แก้ปวดและพฤติกรรมในสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดจากใบกระท่อม มีฤทธิ์แก้ปวด โดยออกฤทธิ์บางส่วนที่ตัวรับโอปิออยด์ ในระบบโอปิออยด์ที่อยู่เหนือไขสันหลังขึ้นไป

งานวิจัยของกิตติศักดิ์และคณะ<sup>(32)</sup> ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทรานาจินินเพื่อ งานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากกระท่อม ในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดจากใบพืชกระท่อมมีฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli*



รูปภาพที่ 2 แสดงตัวอย่าง โครงสร้างอัลคาลอยด์ที่พบในใบกระท่อม

## 2.4 โรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรียเป็น โรคติดเชื่อทางปรสิต มียุงก้นปล่องเพศเมียเป็นภะนำโรคไปสู่มนุษย์ (*Anopheles Mosquitoes*) อาการเริ่มต้นมักเป็นอาการที่ไม่จำเพาะ อาการที่พบได้บ่อยที่สุด คือ มีไข้ โดยระยะพักตัวของเชื้อขึ้นอยู่กับชนิด โดยทั่วไปประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ ยกเว้นระยะพักตัวของ *P. malariae* ที่อาจนานถึง 1 เดือน มักมีอาการปวดศีรษะอ่อนเพลีย ไม่มีเรี่ยวแรง ปวดท้อง ปวดกล้ามเนื้อและข้อ ร่วมกับไข้ หนาวสั่น มีเหงื่อออก รู้สึกเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ในผู้ป่วยเด็ก อาจมีอาการซึม กินอาหารไม่ได้ ไอ ตัวชืด ตับม้ามโต หากได้รับการวินิจฉัยและรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็ว ในระยะนี้สามารถหายขาดได้ แต่หากไม่ได้รับการรักษาหรือได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสม โรคจะดำเนินไปสู่ระยะรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะ โรคมาลาเรียชนิดฟัลซิฟาร์ม

อาการของโรคมาลาเรียที่รุนแรง จะพบอาการ ระดับสติสัมปชัญญะลดลงหรือหมดสติ อ่อนเพลียมาก ซัก เหนื่อยหอบ น้ำท่วมปอด ช็อก ไตวาย ตัวเหลืองตาเหลืองร่วมกับอวัยวะสำคัญ

ทำงานผิดปกติ เลือดออกผิดปกติ ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ ภาวะเลือดเป็นกรด ปัสสาวะสีเข้ม (Hemoglobinuria) ระดับแลคเตท (Lactate) ในเลือดสูง จากการศึกษารายงานของโรงพยาบาล เวชศาสตร์เขตร้อนพบว่า เพศหญิงที่มีระดับอัลบูมินในเลือดต่ำ ค่า BUN-Creatinine Ratio >20 มีโอกาสเกิดภาวะช็อกสูง ในประเทศไทยผู้ป่วยที่มีจำนวนเชื้อมาลาเรียในเลือดมากกว่าร้อยละ 5 มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดมาลาเรียรุนแรง และพบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะ Schizontemia มีโอกาสเกิดมาลาเรียรุนแรงถึงร้อยละ 39.6(33)

แม้ว่ารายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization) เกี่ยวกับโรคมาลาเรีย ช่วงระหว่างปี 2543- 2558 พบว่าอัตราการเกิดโรคลดลง 37% และอัตราการตายของผู้ป่วยลดลง 60%<sup>(34)</sup> อย่างไรก็ตาม พบว่ารายงานผู้ติดเชื้อสูงถึง 214 ล้านคนทั่วโลก และผู้เสียชีวิตสูงถึง 438,000 คนทั่วโลก ดังนั้นโรคมาลาเรียยังคงเป็นโรคระบาดที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของหลายประเทศทั่วโลก เชื้อปรสิตที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียไปสู่มนุษย์ประกอบด้วยเชื้อปรสิต 5 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาลัม (*Plasmodium falciparum*) 2) เชื้อพลาสโมเดียม ไวแวก (*Plasmodium vivax*) 3) เชื้อพลาสโมเดียม มาลาเรียอี (*Plasmodium malariae*) 4) เชื้อพลาสโมเดียม โอวาเล (*Plasmodium ovale*) และ 5) เชื้อพลาสโมเดียม โนวาไซน์ (*Plasmodium knowlesi*)<sup>(35)</sup> โดยผู้ป่วยติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาลัม พบว่ามีความรุนแรงและอัตราการตายมากที่สุด โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนต่อสมองจากเชื้อมาลาเรีย (cerebral malaria) พบว่าผู้ป่วยภาวะนี้มักมีอาการแย่ลงอย่างรวดเร็วและตายได้ภายใน 24 ชั่วโมง<sup>(36),(37)</sup>

ในประเทศไทยปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วยโรคไข้มาลาเรียปีละไม่ถึงหนึ่งหมื่นราย โดยพื้นที่ที่ยังพบโรคไข้มาลาเรียเป็นบริเวณจังหวัดใกล้ชายแดนที่มีป่าเขาเชื่อมต่อกับประเทศเพื่อนบ้าน โดยยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรีย มักอาศัยอยู่ในป่าเขาที่มีลักษณะชุ่มชื้น ชายป่า หรือสวนยางพารา หรือในหมู่บ้านที่มีต้นไม้รกชื้น ยุงก้นปล่องจะวางไข่ตามแหล่งน้ำลำธารที่มีน้ำขัง หรือน้ำไหลเอื่อย ยุงก้นปล่องออกหากินเวลาพลบค่ำถึงรุ่งเช้า ผู้ที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคไข้มาลาเรียจึงเป็นผู้ที่มีอาชีพในการหาของป่าล่าสัตว์ กรีดยาง เฝ้าสวนไร่ เช่น ทหาร ตำรวจตระเวนชายแดน เจ้าหน้าที่ป่าไม้ แม้กระทั่งนักท่องเที่ยวและผู้เดินทางเข้าไปพักค้างแรมในป่าที่อาจเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงได้ อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยโรคไข้มาลาเรียสามารถพบได้ทุกแห่งทั่วประเทศ แม้สถานการณ์ไข้มาลาเรียลดลง กลับส่งผลให้พบผู้ป่วยอาการรุนแรงได้มากขึ้น เนื่องจากภูมิคุ้มกันโรคมาลาเรียในประชากรลดลง โดยประเทศไทย พบปัญหาการติดต่อยารักษาโรคมาลาเรีย โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งเชื้อ *P.falciparum* ในปี พ.ศ. 2562 พบว่าการรักษามาลาเรียชนิดฟัลซิพาร์ม ด้วยยา Dihydroartemisinin-Piperaquine ในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานีให้ผลลดลงเหลือไม่ถึงร้อยละ 90 คณะกรรมการนโยบายและแนวทางการใช้ยารักษามาลาเรียแห่งชาติ จึงได้มีมติให้เปลี่ยนสูตรยาที่ใช้ในการรักษามาลาเรียชนิดฟัลซิพาร์มในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานี เป็นสูตรยาผสม Fixed-dose combination ของ Artesunate-Pyronaridine!แทนตั้งแต่ พ.ศ. 2562 เป็นต้นไป<sup>(11)</sup>

## 2.5 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

วงจรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียม มี 2 ระยะ ดังนี้ (ภาพที่ 3 )

2.5.1 วงจรชีวิตแบบอาศัยเพศในยุงพาหะ (Sporogony) เมื่อยุงก้นปล่องกัดและดูดเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียระยะอาศัยเพศเข้าไป (Gametocyte) เชื้อจะเข้าสู่กระเพาะอาหารของยุง ซึ่งเป็นเชื้อใน ระยะ ที่มีทั้งเชื้อเพศผู้ (Microgametocyte) และเชื้อเพศเมีย (Macrogametocyte) จะผสมพันธุกรรมกันจนกลายเป็น Zygote และเข้าสู่ระยะ Sporogony เจริญไปเป็น Ookinete แทรกตัวผ่านผนังกระเพาะออกมาอยู่ระหว่างช่องเยื่อหุ้มกระเพาะอาหารจนเป็น Oocyst ซึ่งมี Sporozoite จำนวนมากบรรจุอยู่ภายใน เมื่อผนังของ Oocyst แตกออก Sporozoite จะกระจายเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดของยุงและไปที่ต่อมน้ำลายยุงพร้อมเข้าสู่กระแสนี้เลือดคนและเจริญเป็นวงจรชีวิตแบบไม่มีเพศในคน ดังภาพที่ 3

2.5.2 วงจรชีวิตแบบไม่อาศัยเพศในคน (Schizogony) เป็นการสืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียโดยการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยไม่มีการผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งมี 2 ระยะย่อย ดังนี้

2.5.2.1 ระยะในเซลล์ตับ (Exo-erythrocytic schizogony) เมื่อ Sporozoite เข้าสู่กระแสเลือดคน เชื้อจะเข้าสู่เซลล์ตับ ภายในเวลาครึ่งชั่วโมง นิวเคลียสของ Sporozoite จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ เข้าสู่ในระยะ Schizont ที่มี Merozoite จำนวนหลายพันตัว ส่งผลทำให้เซลล์ตับแตก ซึ่งใช้เวลาหลังจากคนได้รับเชื้อประมาณ 6 – 16 วัน เมื่อเซลล์ตับแตก Merozoite จะกระจายออกไปและเข้าไปอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดง

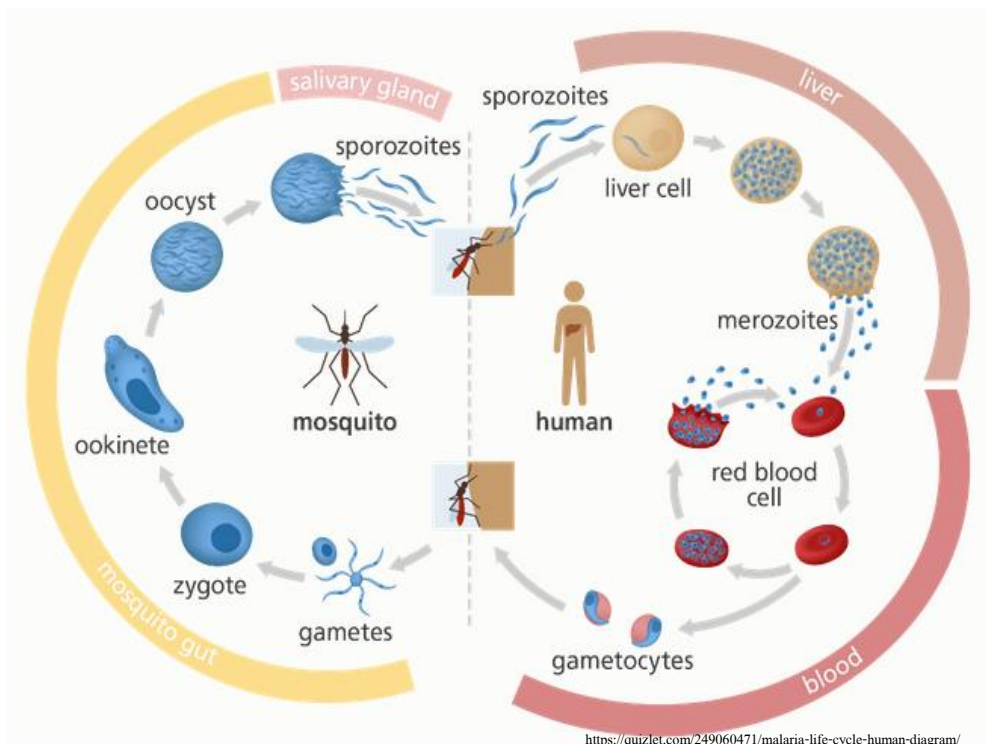
ส่วนการติดเชื้อ *P. vivax* และ *P. ovale* เชื้อในระยะ Sporozoite บางส่วนจะเข้าไปอยู่ในเซลล์ตับ โดยไม่มีการแบ่งตัวนานเป็นสัปดาห์หรือเดือน จนกระทั่งเป็นปีถึงจะเจริญและแบ่งตัวอีกครั้ง ทำให้เกิดไข้กลับ (relapse) เรียกเชื้อที่พักตัวอยู่ในตับว่า Hypnozoite

2.5.2.2 ระยะในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocytic schizogony) Merozoite จะเจริญต่อไปเป็น Immature trophozoite (ring form) และ Mature trophozoite ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่ระยะ Schizont จะมีการแบ่งตัวของนิวเคลียสออกไปเป็น Merozoite จำนวนมาก จนเม็ดเลือดแดงแตกออก Merozoite เข้าสู่กระแสเลือด และเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่เป็นวงจรชีวิต ไม่มีเพศในคนในระยะเม็ดเลือดแดง ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการไข้นาวสั้นเนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตก หลังเกิดอาการไข้นาวสั้น 3 – 15 วัน Merozoite บางส่วนที่เข้าเม็ดเลือดแดง จะเปลี่ยนสภาพไปเป็นระยะมีเพศ เรียกว่า Gametocyte ซึ่งในระยะนี้หากมียุ่งกันปล่องมากัดคนที่มีเชื้ออยู่ จะกลับเข้าสู่วงจรชีวิตแบบอาศัยเพศในยุงพาหะ และแพร่เชื้อต่อไป<sup>(11)</sup>

## 2.6 Malaria pigment

Malaria pigment หรือ Hemozoin เป็นรงควัตถุสีน้ำตาลดำจำพวก hematin ที่เกิดจากธาตุเหล็กในรูปสารประกอบ ferrous ที่เป็นองค์ประกอบของ heme ถูกปล่อยออกมาและ oxidize เป็นสารประกอบ ferric ซึ่ง hemozoin นี้ เป็นสารที่เหลือจากการย่อยเม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรียในระยะ trophozoite เมื่อเม็ดเลือดแดงแตกออก ทำให้ hemozoin กระจายออกมาพร้อม merozoite ใหม่ และถูกเก็บกินโดย macrophage ในขณะที่ merozoite จะถูกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ ในอวัยวะตับ เมื่อเซลล์ตับแตกจากการติดเชื้อมาลาเรีย malaria pigment จะถูกเก็บกินโดย Kupffer cell และ histiocyte ทำให้ sinusoid ขยายออกและมีเลือดคั่ง ส่งผลให้ตับมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือตับโต<sup>(38)</sup>





### รูปภาพที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในระยะต่าง ๆ

ที่มา <https://quizlet.com/249060471/malaria-life-cycle-human-diagram/> สืบค้นเมื่อวันที่ 7

กุมภาพันธ์ 2565

การรักษาโรคมาลาเรียโดยใช้ยาต้านมาลาเรียหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อปรสิต เช่น ยาคลอโรควิน (chloroquine) ยาควินิน (Quinine) และ ยาไพรม์มาควิน (Primaquine) อย่างไรก็ตามกลับพบรายงานการดื้อยาที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการดื้อต่อยาคลอโรควิน ดังนั้นการปรับเปลี่ยนยาตัวใหม่ในการรักษาโรคมาลาเรียจึงมีความสำคัญ ยาอาทิซุนเนท (Artesunate) เป็นอนุพันธ์ของยาอาทิมีสทริน (Artemisinin) ที่นิยมนำมาใช้และให้ผลการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน รวมไปถึงมีคุณสมบัติการต้านการอักเสบ<sup>(39)</sup> การศึกษาของ Reis และคณะ<sup>(40)</sup> การสูญเสียความทรงจำในภาวะแทรกซ้อนต่อสมองจากเชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์ สามารถฟื้นฟูเมื่อได้รับการรักษาควบคู่กันระหว่างยาคลอโรควินและสารสกัด N-acetylcysteine นอกจากนี้พบว่าเมื่อให้การรักษาหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมเบอเกอีย (*Plasmodium berghei*) ด้วยยาอาทิซุนเนทควบคู่กับสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione พบว่าหนูไมซ์มีอัตราการรอดชีวิตที่ยาวนานขึ้นและมีปริมาณเชื้อปรสิตในระบบไหลเวียนโลหิตที่ลดลง<sup>(41)</sup>

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้พืชกระท่อมในการรักษามาลาเรีย

พบรายงานการนำพืชกระท่อม สายพันธุ์ *M. inermis* และ *M. ciliate* ซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นแอฟริกา ที่หมอพื้นบ้านนิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย มาทำการทดสอบกับ *Plasmodium falciparum* สามสายพันธุ์ ได้แก่ FcB1-Colombia และ FcM29-Cameroon (สายพันธุ์ที่ดื้อต่อคลอโรควิน) และสายพันธุ์ที่ไวต่อคลอโรควินของไนจีเรีย เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านพลาสโมเดียมและความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง โดยสารสกัดที่ใช้ ได้มาจากน้ำต้มผงกระท่อมซึ่งเป็นเทคนิคที่หมอพื้นบ้านส่วนใหญ่ใช้ ติดตามประเมินฤทธิ์ของสารสกัดที่ใช้กับเชื้อ *P. falciparum* ในหลอดแก้ว ด้วย radioactive micromethod ความ Concentrate ที่ 50% (IC50) อยู่ในช่วง 2.34 ถึงมากกว่า 500 mg·mL<sup>-1</sup> พบว่าเชื้อมีกิจกรรมที่อ่อนแอหรือต่ำมาก พืชกระท่อมสามารถออกฤทธิ์กับ *P. falciparum* เชื้อมาลาเรียก่อโรคในมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับพืชที่ไม่ออกฤทธิ์ด้วยตัวเอง แต่สามารถ metabolised ไปเป็น active drugs ได้<sup>(42)</sup>

เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Steven และคณะ<sup>(43)</sup> ได้ศึกษาความหลากหลายของพืชในการต้านมาลาเรียในแอฟริกา โดยเปรียบเทียบกับยา artemisinin หนึ่งในพืชที่นำมาทดลองคือกระท่อม ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อปรสิต แต่เป็นการทดลองในหลอดทดลอง Steven ได้ให้ข้อเสนอแนะว่า หากจะนำพืชมาใช้ในการรักษามาลาเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีการทดลองในสัตว์

เนื่องจากการศึกษาความรุนแรงของเชื้อมาลาเรีย โดยใช้มนุษย์เป็นแบบจำลองนั้น ไม่สามารถปฏิบัติได้ในทางจริยธรรมของมนุษย์ โดยเฉพาะการติดเชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิพาลัม (*Plasmodium falciparum*) ซึ่งการศึกษาของ Reis และคณะเมื่อปี 2010<sup>(40)</sup> เป็นที่ยอมรับโดยมากกว่าแบบจำลองหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรียความสอดคล้องของทางพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของตับ ม้าม รวมไปถึงระดับชีวโมเลกุล ในหนูทดลอง ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นแบบจำลองการศึกษาความรุนแรงของโรคมาลาเรียทดแทนมนุษย์ได้

จากงานวิจัยข้างต้น เป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากในประเทศไทย ยังไม่พบรายงานการนำพืชกระท่อมมาใช้ศึกษาคุณสมบัติในการรักษาโรคมาลาเรีย ซึ่งพื้นที่ในประเทศไทยยังคงมีบริเวณที่เป็นป่าเขาที่มีลักษณะชุ่มชื้น ชายป่า สวนยางพารา หรือในหมู่บ้านที่มีต้นไม้รกชื้นอยู่อีกมาก ซึ่งยังเสี่ยงต่อการเกิดโรคมาลาเรียที่รุนแรง ประกอบกับพืชกระท่อมถูกนำมาศึกษาในทางการแพทย์มากขึ้น หาซื้อได้ง่าย เป็นพืชที่มีเป็นประโยชน์มากกว่าการนำมาเป็นสารเสพติด ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะนำสารสกัดจากใบกระท่อม มาทำการศึกษาในหนูทดลอง เพื่อศึกษาผลของการใช้สารสกัดจาก

ใบกระท่อม ในการรักษามาลาเรียในหนู เพื่อให้หนูทดลองได้รับสารสกัดใบกระท่อมในปริมาณที่แน่นอน ผู้วิจัยจึงให้สารสกัด ด้วยวิธี gavage เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจะนำอวัยวะที่เกี่ยวข้อง เช่น ตับ ม้าม และไต มาศึกษาพยาธิสภาพ โดยในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาถึงความผิดปกติของตับ ในหนู ไมซ์ ใช้วิธีตรวจดูทางจุลกายวิภาคศาสตร์ จากการตัด section พาราฟฟินบล็อก ย้อมสี H&E นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิเคราะห์ผล





### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 3.1 การเตรียมงานวิจัย

###### 3.1.1 อุปกรณ์

- 3.1.1.1 เข็มฉีดยา เบอร์ 26x $\frac{1}{2}$ "
- 3.1.1.2 กระจกชนิดชา
- 3.1.1.3 เข็มป้อนสาร เบอร์ 18
- 3.1.1.4 micro capillary tube (Sodium Heparinized - Red Tip, GS-51686)
- 3.1.1.5 กรรไกรผ่าตัด (German)
- 3.1.1.6 แผ่นสไลด์แก้ว
- 3.1.1.7 ถังมือยาง (ศรีตรัง)
- 3.1.1.8 Erlenmeyer flask (German)
- 3.1.1.9 Eppendorf
- 3.1.1.10 ฝักก๊อช
- 3.1.1.11 เข็อกฟ้าสีขาว
- 3.1.1.12 สายน้ำเกลือ
- 3.1.1.13 ถังน้ำเกลือ
- 3.1.1.14 เครื่อง centrifuged (HEMOFUGE, SIPD-D-6515-014-002/39)
- 3.1.1.15 เครื่อง Embedding (Thermo Scientific, HistoSTAR)
- 3.1.1.16 เครื่อง Microtome (Leica, HistoCore Biocut)
- 3.1.1.17 เครื่องเชื่อมอัตโนมัติ (Thermo, GeminiAS)
- 3.1.1.18 ชุดถ่ายภาพ (Olympus microscope, DP70)
- 3.1.1.19 ImageJ software 1.51j8 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)
- 3.1.1.20 เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 3.1.1.21 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical Balance)
- 3.1.1.22 เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)

- 3.1.1.23 เครื่องให้ความร้อน (hot plate)
- 3.1.1.24 ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
- 3.1.1.25 กระดาษลิสมิต
- 3.1.1.26 แผ่น TLC สำหรับทำ Thin Layer Chromatography
- 3.1.1.27 กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper No.1)

### 3.1.2 สารเคมี

- 3.1.2.1 ยา artesunate (catalog No. 43-002501, ACT imported by Atlantic pharmaceutical. Co., Ltd., Thailand)
- 3.1.2.2 5% sodium bicarbonate
- 3.1.2.3 0.9% NSS
- 3.1.2.4 Ketamine
- 3.1.2.5 Xylazine
- 3.1.2.6 Propylene glycol
- 3.1.2.7 tween 80
- 3.1.2.8 methanol
- 3.1.2.9 ี๊ Giemsa (catalog No. 51811826, MERCK)
- 3.1.2.10 ี๊ Hematoxylin
- 3.1.2.11 ี๊ Eosin
- 3.1.2.12 สารละลาย PBS
- 3.1.2.13 methanol (catalog No. 57-56-1, Sigma-Aldrich)
- 3.1.2.14 70% alcohol
- 3.1.2.15 80% alcohol
- 3.1.2.16 95% alcohol
- 3.1.2.17 Absolute alcohol
- 3.1.2.18 Xylene
- 3.1.2.19 10% paraformaldehyde
- 3.1.2.20 Acid alcohol
- 3.1.2.21 Aluminum ammonium sulfate

3.1.2.22 Mercuric oxide

3.1.2.23 Paraffin

3.1.2.24 ใบกระท่อมสดจากจังหวัดราชบุรี

3.1.2.25 สารละลายเกลืออิ่มตัว (saturated salt solution)

3.1.2.26 Anhydrous sodium sulfate (anh.Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

3.1.2.27 Ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH)

3.1.2.28 Ethanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)

3.1.2.29 Water (H<sub>2</sub>O)



### 3.2 การเตรียมสารสกัดใบกระท่อม

3.2.1 นำใบกระท่อมที่ตากแห้งมาบดให้ละเอียด และชั่งมา 20.00 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask  
3.2.2 เติมตัวทำละลายเอทานอล (Ethanol) 500 มิลลิลิตร แล้วนำไป stirred เป็นเวลา 2.0 ชั่วโมง

ดังรูป



รูปภาพที่ 4 การ stirred สารตัวอย่างกับตัวทำละลายเอทานอล

3.2.3 นำสารที่ได้ไปกรองลดความดัน เพื่อแยกกากกระท่อมออกจากสารละลาย



รูปภาพที่ 5 กรองลดความดันสารที่ได้

3.2.4 นำสารละลายที่ได้ไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator



**รูปภาพที่ 6** ระเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator

3.2.5 ปล่อยให้สารละลายแห้งสนิท แล้วนำไปชั่งน้ำหนักของ Crude ที่ได้ พร้อมกับจดบันทึก

### 3.3 ความเข้มข้นของสารสกัดใบกระท่อมที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบกระท่อม จำนวน 2 ปริมาตร คือ 75 mg/kg และ 150 mg/kg จากรายงานของ Saidin และคณะ<sup>(44)</sup> ที่ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดแอลคาลอยด์จากพืชกระท่อมต่อเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า สารสกัดจากพืชกระท่อมเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2, HEK 293, MCL-5, cHol และ SH-SY5Y แบบขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent manner) โดยความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรทำให้เซลล์ตายทั้งหมด ในขณะการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดพืชกระท่อมในสัตว์ทดลองแบบเฉียบพลันมีรายงานว่าค่า LD50 (Lethal Dose 50%) ของสารสกัดแอลคาลอยด์จากพืชกระท่อมมีค่าเท่ากับ 173.20 ถึง 591 มิลลิกรัม/กิโลกรัม<sup>(25),(45)</sup> รายงานของ Singh และคณะ<sup>(46)</sup> ทำการศึกษาความเป็นพิษของพืชกระท่อมต่อค่าพารามิเตอร์ทางห้องปฏิบัติการทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิกของเลือด (hematological and clinical-chemistry parameters) โดยให้สารสกัดในปริมาณ 76.3-114.8 มิลลิกรัมต่อวันแก่อาสาสมัครที่ใช้พืชกระท่อม พบว่าผลเลือดทางห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มีค่าไม่แตกต่างจากอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรง

ดังนั้น ปริมาณความเข้มข้นที่นำมาประยุกต์ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ที่ 75 mg/kg และ 150 mg/kg จึงไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อหนูทดลอง

### 3.4 ยา artesunate ที่ใช้ในการทดลอง

ยาอาทิซุเนท (Artesunate) เป็นยาต้านเชื้อมาลาเรียมาตรฐานที่ได้รับคำแนะนำจากองค์การอนามัยโลกใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย โดยปริมาณยาที่แนะนำให้ใช้ในเด็กที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 20 kg. ควรได้รับ Artesunate 3 mg/kg /dose ในเด็กหรือผู้ใหญ่ที่มีน้ำหนัก  $\geq 20$  kg ควรได้รับยา 2.4 mg/kg /dose<sup>(47)</sup> ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้หนู ICR เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนัก 25-30 กรัม ซึ่งจากรายงานของ Nacer A และคณะ<sup>(48)</sup> พบว่าหนูทดลองในช่วงอายุ 6 สัปดาห์มีระบบภูมิคุ้มกันใกล้เคียงกับมนุษย์ในวัยผู้ใหญ่ ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้ปริมาณยา ART ที่ขนาด 2.4 mg/kg /dose เทียบเท่ากับวัยผู้ใหญ่ของมนุษย์

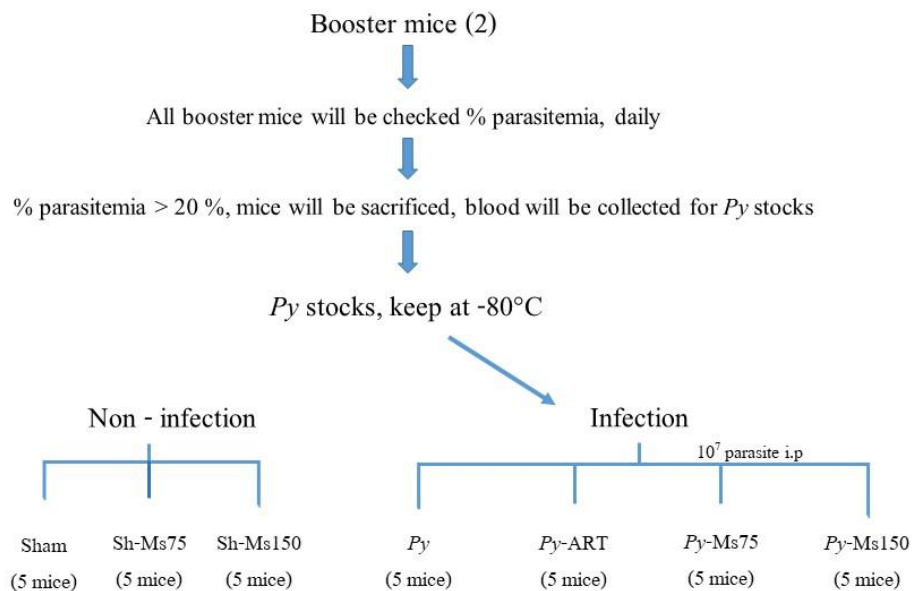
การเตรียมยาจะเริ่มจากการผสมผงยากับ 5% sodium bicarbonate ให้มีปริมาณ 1 ml จากนั้นเติม 0.9% NSS ลงไป 5 ml จะได้ปริมาณรวมทั้งหมด 6 ml โดยมีปริมาณยา 10 mg/ml ใช้โดยวิธีการฉีดสารเข้าทางช่องท้อง (i.p.)

### 3.5 ปริมาณเชื้อ *Plasmodium yoelli*

*Plasmodium yoelli* (Py) 17XL stock parasite: เชื้อ Py ได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.น.สพ. ดร.มรกต แก้วธรรมสอน, (D.V.M., M.Sc., Ph.D.) ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เชื้อตั้งต้นจาก Prof. Dr. Motomi Torii, Ehime University School of Medicine และ Prof. Dr. Osamu Kaneko, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, ประเทศญี่ปุ่น). Stock Py ถูกเก็บไว้ในตู้เย็น  $-80^{\circ}\text{C}$

เชื้อ Py ที่นำมาใช้และสามารถชักนำให้เกิดพยาธิสภาพได้ มีปริมาณอยู่  $1 \times 10^6$  pRBCs<sup>(49)</sup> ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีการอ้างอิงและประยุกต์ปริมาณการฉีดเชื้อที่  $1 \times 10^7$  pRBCs ในปริมาณ 0.2 ml แก่หนูทดลองเพื่อชักนำให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง

เพื่อประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคมาลาเรีย stock ของเชื้อ Py จะถูกนำมา booster โดยใช้หนูไม่ซ้ทำหน้าที่เป็น booster จำนวน 2 ตัว ทำการฉีด stock ของเชื้อ Py ปริมาณ 0.2 ml ผ่านทางช่องท้องหนูทดลอง จากนั้นติดตามการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดง (parasitemia) ด้วยวิธี thin slide smear ทุกวัน หลังการฉีดเชื้อและย้อมสีสไลด์ด้วยวิธี giemsa staining จากนั้นติดตามและตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ เมื่อ มีการเจริญเติบโตไปถึง ~20% หนูทดลอง booster จะถูก sacrificed และเก็บเลือดทาง cardiac puncture จากนั้นนำไปคำนวณปริมาณการติดเชื้อ Py ในเม็ดเลือดแดงที่  $1 \times 10^7$  pRBCs ที่ เพื่อนำไปชักนำให้เกิดการติดเชื้อต่อไป ยังกลุ่มการ (ภาพที่ 7)



รูปภาพที่ 7 การ Booster ของ stock เชื้อพลาสโมเดียมในหนูทดลอง





### 3.6 กลุ่มสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษานี้ ใช้หนูไมซ์ ICR เพศเมีย อายุ 4-6 สัปดาห์ที่มีน้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม จำนวน 37 ตัว ได้รับหนูไมซ์จากบริษัท โนมูระสยามอินเตอร์เนชั่นแนลจำกัด(ประเทศไทย) นำเข้ามาศึกษาที่ศูนย์สัตว์ทดลองศิริราชเป็นเวลา 1 สัปดาห์ อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  °C ควบคุมแสงไฟฟ้า สว่าง 12 ชั่วโมง และมีด 12 ชั่วโมง ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป และน้ำ ตามปกติ ตลอดระยะทำการทดลอง ตามมาตรฐานการดูแลสัตว์ทดลอง ได้รับการอนุมัติขอรับรองจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (SI-ACUC) ที่ 010/2559 มหาวิทยาลัยมหิดล และทำการชั่งน้ำหนักทุก 3 วัน พร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมและลักษณะโดยทั่วไปของหนูในแต่ละวัน

ตารางที่ 1 แสดงชนิดสายพันธุ์หนูไมซ์ที่นำมาศึกษาผลของสารสกัดใบกระท่อมทั้งหมด 37 ตัว หนูทดลองจำนวน 2 ตัว จะถูกนำมาใช้เป็น Booster

ชนิด	สายพันธุ์	Strain/ Stock	อายุ	น้ำหนัก	เพศ	จำนวน
หนูไมซ์	ICR	<i>Mus Musculus</i>	4-6 สัปดาห์	25-30 กรัม	เมีย	37



### 3.7 วิธีการแบ่งกลุ่มศึกษา

หนูทดลองจะถูกสุ่มแบ่งกลุ่มอย่างละเท่า ๆ กันออกเป็นทั้งหมด 7 กลุ่ม ประกอบด้วยหนูทดลองจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการแบ่งกลุ่มหนูทดลอง การติดเชื้อมาลาเรีย *Py* รวมถึงชนิดของสารที่ได้รับและวิธีการให้ ในกลุ่มหนูทดลอง 7 กลุ่ม

กลุ่มหนูทดลอง (n=21)	การได้รับเชื้อ <i>Plasmodium yoelii</i>	ปริมาณสารที่ได้รับ	จำนวน หนู	วิธีการได้รับสาร
กลุ่ม 1 Sham	-	NSS 0.2 ml/mice	5	Intraperitoneal(i.p.)
กลุ่ม 2 Sh-Ms75	-	สารสกัดใบกระเทียม 2.25 mg/30 g/mice (75 mg/kg)	5	Oral gavage
กลุ่ม 3 Sh-Ms150	-	สารสกัดใบกระเทียม 4.5 mg/30 g/mice (150 mg/kg)	5	Oral gavage
กลุ่ม 4 <i>Py</i>	√	-	5	-
กลุ่ม 5 <i>Py</i> -ART	√	Artesunate 2.4 mg/kg	5	Intraperitoneal(i.p.)
กลุ่ม 6 <i>Py</i> -Ms75	√	สารสกัดใบกระเทียม 2.25 mg/30 g/mice (75 mg/kg)	5	Oral gavage
กลุ่ม 7 <i>Py</i> -Ms150	√	สารสกัดใบกระเทียม 4.5 mg/30 g/mice (150 mg/kg)	5	Oral gavage

หนูทดลองทั้งหมดถูกสุ่มแบ่งเป็น 7 กลุ่ม สามกลุ่มแรกเป็นหนูกลุ่มไม่ติดเชื้อ เรียกว่า Sham group (SH group) ส่วนอีก 4 กลุ่มหลัง คือหนูกลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับการรักษาจากสารที่แตกต่างกัน มีรายละเอียดดังนี้

กลุ่มที่ 1 Sham คือกลุ่มหนูทดลองที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อพลาสโมเดียมโฮอีไลและได้รับ NSS ปริมาณ 0.2 ml/mice โดยวิธีการฉีดสารเข้าทางช่องท้อง (i.p.)

กลุ่มที่ 2 Sh-Ms 75 คือกลุ่มหนูทดลองที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อพลาสโมเดียมโฮอีไลและได้รับ สารสกัดใบกระเทียม ปริมาณ 75 mg โดยคิดเป็น 2.25 mg/30 g/mice โดยวิธีการ Oral gavage

กลุ่มที่ 3 Sh-Ms 150 คือกลุ่มหนูทดลองที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อพลาสโมเดียมโฮอีไลและ ได้รับสารสกัดใบกระเทียม ปริมาณ 150 mg โดยคิดเป็น 4.5 4.5 mg/30 g/mice โดยวิธีการ Oral gavage

กลุ่มที่ 4 Py คือกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพลาสโมเดียมโฮอีไล จำนวน  $1 \times 10^7$  ของ เชื้อพลาสโมเดียม โฮอีไลต่อหนึ่งตัว โดยวิธีการฉีดสารเข้าทางช่องท้อง (i.p.)

กลุ่มที่ 5 Py- ART คือกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพลาสโมเดียมโฮอีไล จำนวน  $1 \times 10^7$  ของเชื้อพลาสโมเดียม โฮอีไลต่อหนึ่งตัว และได้รับยา Artesunate ปริมาณ 2.4 mg/kg โดย วิธีการฉีดสารเข้าทางช่องท้อง (i.p.)

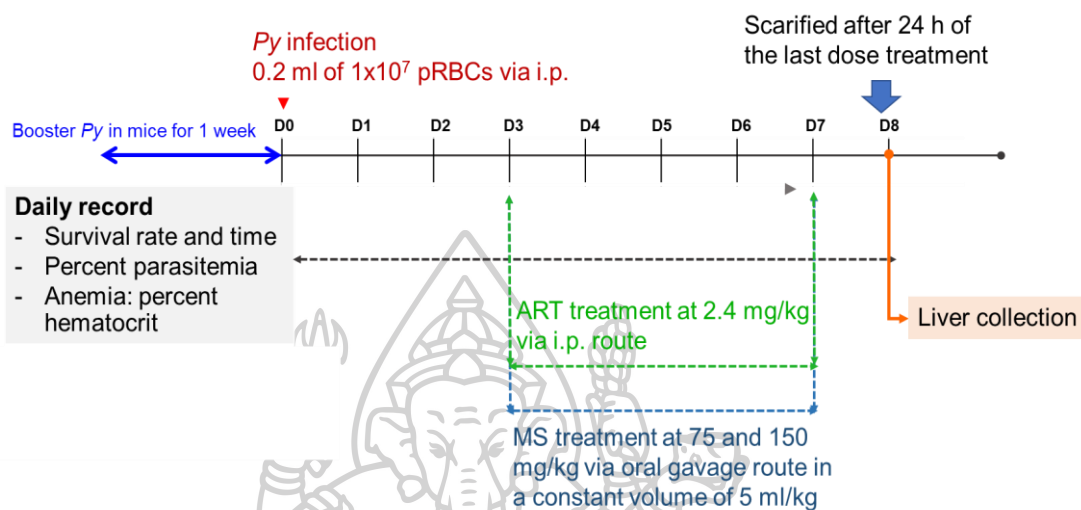
กลุ่มที่ 6 Py- Ms 75 คือกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพลาสโมเดียมโฮอีไล จำนวน  $1 \times 10^7$  ของเชื้อพลาสโมเดียม โฮอีไลต่อหนึ่งตัว และได้รับสารสกัดใบกระเทียมปริมาณ 2.25 mg/mice โดยวิธีการ Oral gavage ปริมาณ 75 mg โดยคิดเป็น 2.25 mg/30 g/mice

กลุ่มที่ 7 Py- Ms 150 คือกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อพลาสโมเดียมโฮอีไล จำนวน  $1 \times 10^7$  ของเชื้อพลาสโมเดียม โฮอีไลต่อหนึ่งตัว และได้รับสารสกัดใบกระเทียมปริมาณ 150 mg โดย คิดเป็น 4.5 4.5 mg/30 g/mice โดยวิธีการ Oral gavage

### 3.8 ระยะเวลาของการทดลอง

ช่วงระยะเวลาในการทดลอง จะใช้เวลา 7 วัน โดยมีการเก็บเลือดจากปลายหางหนูทดลอง ทุกวันเพื่อตรวจเช็คปริมาณ Hematocrit และ %Parasitemia เป็นค่าตั้งต้น จากนั้นจะเริ่มฉีดเชื้อ Py ที่ D0 ในทุกวัน จะจดบันทึกอัตราการตาย ปริมาณ การเปลี่ยนแปลงของ Hematocrit และ

%Parasitemia เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ Day 8 ทำการเก็บอวัยวะตับเพื่อนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกกลุ่มการทดลอง



รูปภาพที่ 8 แสดงช่วงระยะเวลาในการทดลอง



### 3.9 การดำเนินการวิจัย

#### 3.9.1 การป้อนสารสกัดใบกระท่อมในหนูทดลอง

สารสกัดใบกระท่อมอยู่ในรูปแบบของผง ซึ่งยากต่อการป้อนให้สัตว์ทดลอง จึงต้องนำมาละลายใน Cosolvent โดยการนำสาร Propylene glycol : tween 80 : Dw มาผสมในอัตราส่วน 4:1:4 ใน Eppendorf<sup>(50)</sup> จากนั้นจึงนำสารสกัดใบกระท่อม มาละลายใน cosolvent และนำไปป้อนในหนูทดลอง ด้วยวิธี oral gavage มีขั้นตอนดังนี้

3.9.1.1 เลือกขนาดเข็มป้อนสารให้เหมาะสมกับน้ำหนักตัวหนูทดลอง ใน การทดลองนี้ ใช้เข็มป้อนสารขนาด 18 นิ้ว

3.9.1.2 ทำการวัดตำแหน่งการสอดท่อป้อนอาหารที่เหมาะสม โดยจับหนูทดลองที่หน้าคอกอย่างนุ่มนวลแล้วหามือขึ้นให้อยู่ในท่ายื่น จากนั้นวัดระยะการสอดใส่จากปลายจมูกหนูจนถึงระดับกระดูก xiphoid หรือปลายกระดูก sternum โดยจะป้อนไม่ให้ลึกกว่าระดับนี้

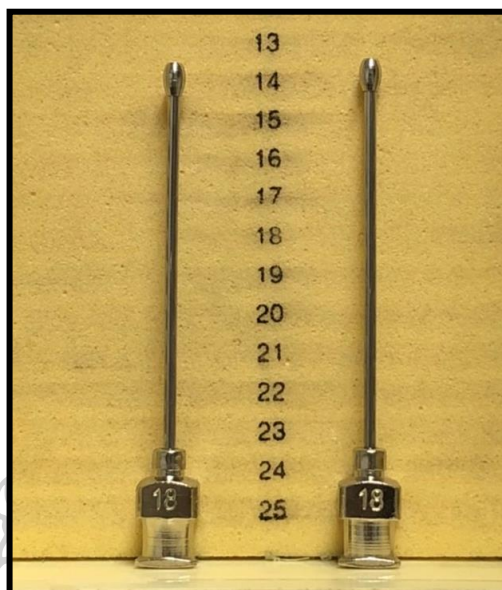
3.9.1.3 ค่อยๆ สอดใส่ tube ผ่านทางปากตลอด upper palate จนถึง esophagus อย่างนุ่มนวล ให้สอดคล้องกับการกลืนของหนูทดลอง หากเกิดการติดขัดขณะสอดใส่จะไม่ดันต่อไป เพื่อป้องกันการบาดเจ็บของทางเดินอาหารหรือทางเดินหายใจ

3.9.1.4 เมื่อปลาย tube ถึงตำแหน่งที่เหมาะสมแล้วทำการดันสารเข้าไปที่ กระเพาะและนำออกอย่างนุ่มนวล

3.9.1.5 วางหนูทดลองลงและสังเกตอาการผิดปกติหลังการ feed เช่น ลักษณะการหายใจ หรือภาวะ distress ภายใน 5-10 นาทีและมีการสังเกตต่อเนื่อง อีกภายใน 12-24 ชม.(51)

3.9.1.6 กลุ่มที่ 1 และ 5 หนูทดลองจะต้องได้รับปริมาณสารสกัดของ 75 mg/kg ที่ 2.25 mg/ตัว โดยคำนวณจากหนูที่หนัก 30 g จากนั้นคำนวณปริมาตรการ ให้ที่ 5 ml/kg คือ ควรได้รับสารในปริมาตร 0.15 ml (150  $\mu$ l) ซึ่งมีปริมาณสารสกัด 2.25 mg/ตัว

3.9.1.7 กลุ่มที่ 2 และ 6 หนูทดลองจะต้องได้รับปริมาณสารสกัดของ 150 mg/kg ที่ 4.5 mg/ตัว โดยคำนวณจากหนูที่หนัก 30 g จากนั้นคำนวณปริมาตรการ ให้ที่ 5 ml/kg คือ ควรได้รับสารในปริมาตร 0.15 ml (150  $\mu$ l) ซึ่งมีปริมาณสารสกัด 4.5 mg/ตัว



รูปภาพที่ 9 เข็มป้อนสารสัตว์ทดลองขนาด 18 นิ้ว

### 3.10 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ และการติดตามภาวะชีวิตของหนูทดลอง

#### 3.10.1 การตรวจนับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ (Percent Parasitemia)

หนูทดลองทุกกลุ่ม จะได้รับการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสติกโมเดียม โยอีไล หลังฉีดเชื้อเข้าไป ทุกวันจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

ปริมาณ parasite ในเลือดเป็นปัจจัยสำคัญในของการมีพยาธิสภาพที่รุนแรง เช่น ภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง ภาวะการหายใจลำบาก ระบบอวัยวะล้มเหลวในหลายส่วน และอาการทางระบบประสาท อาการเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบที่มากเกินไปและความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน<sup>(52),(53)</sup> การศึกษาของ Fu et. al, 2012<sup>(54)</sup> เกี่ยวกับผลกระทบของการติดเชื้อ *Py* (17XL lethal stain) ปริมาณ parasite ในเลือดของหนูที่ติดเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วก่อนที่หนูติดเชื้อจะเสียชีวิตภายใน 8 วัน พบการตายของเซลล์ตับในหนูที่ติดเชื้อ *Py* นอกจากนี้ ยังพบภาวะม้ามโต มีความผิดปกติบริเวณ red pulp และ white pulp ดังนั้นการติดตามปริมาณ parasite จึงเป็นสิ่งที่นำมาใช้บ่งบอกถึงพยาธิสภาพที่รุนแรง ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้การตรวจหาปริมาณเชื้อ parasite โดยใช้เทคนิคการย้อม Blood smear ด้วยสี Giemsa

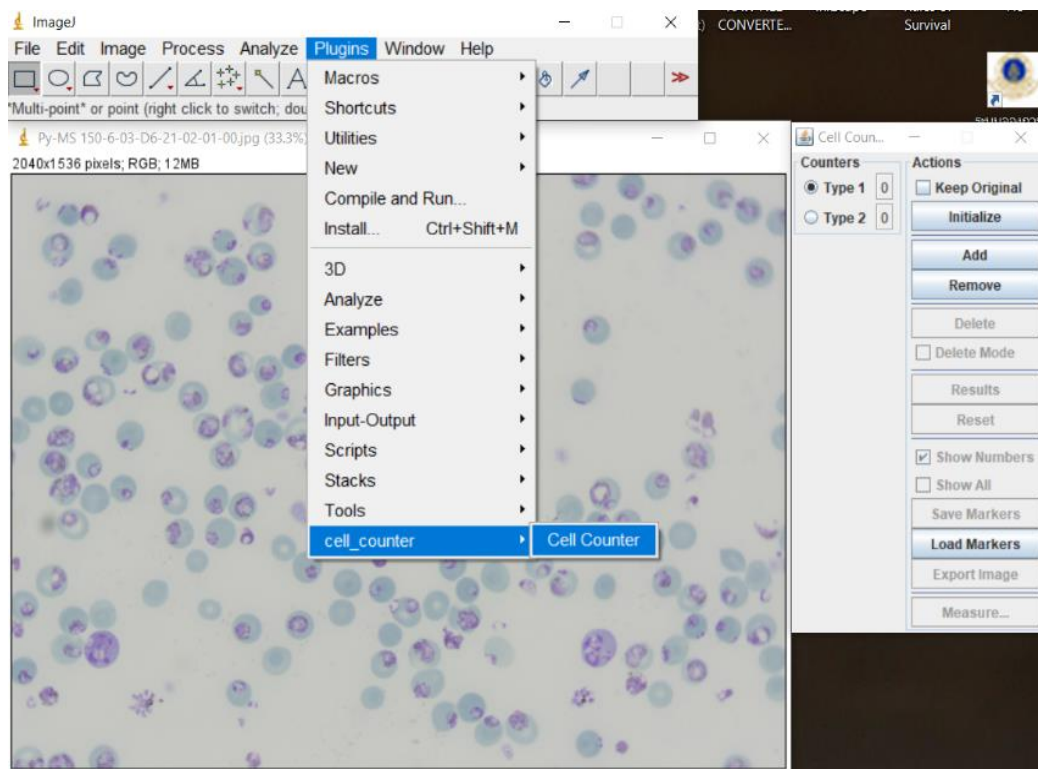
การย้อมด้วยสี Giemsa เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการย้อม Blood smear เชื้อมาลาเรีย สี Giemsa มีส่วนผสมระหว่างสี methylene blue (azure dye) และ สี eosin. โดยสี Eosin มีความเฉพาะเจาะจงกับกลุ่ม phosphate ใน DNA ของเชื้อ parasite และติดสีบริเวณที่มีพันธะ adenine-thymine ปริมาณสูง ในขณะที่สี methylene blue ติดบริเวณ cytoplasm<sup>(55)</sup>

ขั้นตอนการย้อมสี Giemsa โดยสังเขป : ใช้เลือดหนึ่งหยดจากปลายหางของหนู หยดลงบนสไลด์แก้ว ทำการ blood smear เมื่อสไลด์แห้งนำไป Fixation ในเมทานอล โดยการจุ่ม 7-10 ครั้ง จากนั้นย้อมสี Giemsa (1:10) เป็นเวลา 25 นาที และล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำประปา วางไว้แห้ง แล้วจึงนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

การนับ % parasite โดยใช้โปรแกรม ImageJ โดยสังเขป : นำสไลด์ Blood smear ที่ผ่านการย้อมด้วยสี Giemsa ไปถ่ายภาพ ด้วยชุดถ่ายภาพกล้องจุลทรรศน์ (Olympus microscope, DP70) ที่กำลังขยาย 100X จำนวน 5 ภาพ โดยเฉลี่ยให้มีเม็ดเลือดแดงประมาณ 200 เม็ดต่อภาพ (239.89 x 180.62 mm<sup>2</sup> area/ photo)<sup>(56)</sup> จากนั้นนำภาพมาตรวจนับปริมาณการติดเชื้อด้วยโปรแกรม Image J เลือกที่เมนู plugins > cell counter จะแสดงเมนูการนับเซลล์ 2 type โดย type 1 จะใช้สำหรับการนับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ และ type 2 ใช้สำหรับนับเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ ดังที่แสดงไว้ในภาพที่ 10 และนำข้อมูลมาคำนวณโดยใช้สูตรคำนวณดังนี้<sup>(55)</sup>

$$\text{Percent parasitemia (\%)} = \frac{\text{Infected erythrocytes} \times 100}{\text{Total erythrocytes}}$$





รูปภาพที่ 10 ตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ถูกติดเชื้อมีด้วยโปรแกรม Image J

### 3.10.2 ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

เมื่อ parasite เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด เชื้อจะเข้าไปในเซลล์เม็ดเลือดแดง และกินฮีโมโกลบินเป็นอาหาร เมื่อเชื้อ parasite เข้าสู่ระยะ merozoites โตเต็มที่ จะแตกออกจากเม็ดเลือดแดงเดิม เพื่อเข้าไปในเม็ดเลือดแดงใหม่ เรียกว่า hemolysis<sup>(57),(58)</sup> parasite ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดความผิดปกติ ทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการขนส่งออกซิเจน ส่งผลให้เกิดภาวะโลหิตจางขั้นรุนแรง มีอาการแทรกซ้อน เช่น ขาดออกซิเจน หายใจลำบาก มีอาการทางระบบประสาท และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันผิดปกติ<sup>(58),(59)</sup> ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

ขั้นตอน: วันที่ 0 ก่อนเริ่มการทดลอง ทำการเก็บเลือดของหนูทดลองทุกกลุ่ม จากนั้นเก็บเลือดอีกครั้งในวันสุดท้ายของการมีชีวิตของหนูทดลองหลังการติดเชื้อ ซึ่งทำหน้าที่เป็น Hct ก่อนการติดเชื้อและ Hct หลังการติดเชื้อ ตามลำดับ เก็บเลือดจากปลายหางหนูทดลองโดยใช้ microcapillary tube ประมาณ 200-300  $\mu$ l ปิดปลายท่อหนึ่งด้านด้วยดิน

น้ำมัน จากนั้นนำ microcapillary tube เข้าเครื่อง centrifuged ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นคำนวณปริมาตรโดยใช้สูตรคำนวณ ดังภาพที่ 10



รูปภาพที่ 11 สูตรคำนวณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ



### 3.11 การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลอง

ในวันที่ 8 หนูทดลองทุกกลุ่มจะได้รับการ euthanize ภายใต้อาสาสลบที่เป็นส่วนผสมระหว่าง ยา Ketamine ปริมาณ 80 มก./ กก. และ Xylazine 8 มก./ กก. หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดด้วยวิธี cardiac puncture และ perfuse ด้วยน้ำเกลือ 0.9% ตามด้วย สารละลาย PBS โดยหนูทดลองทุกกลุ่ม จะได้รับการตรวจเช็คภาวะสุขภาพและบันทึกอัตราการอยู่รอดในทุกวัน เมื่อประเมินแล้วว่าหนูทดลองมาถึงภาวะสุดท้ายของชีวิต หนูเหล่านั้นจะได้รับการ euthanize หลังจากนั้นทำการ perfuse ด้วยสารละลายข้างต้น ตามด้วยการเก็บเลือด และตับ

#### 3.11.1 การ Euthanize

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ก่อนทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะจากหนูไมซ์ ต้องทำการ euthanize ภายใต้อาสาสลบที่เป็นส่วนผสมระหว่างยา Ketamine ปริมาณ 240 มก./ กก. และ Xylazine 24 มก./ กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (i.p.) และปล่อยให้หนูตายอย่างสงบ ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือด และ perfusions

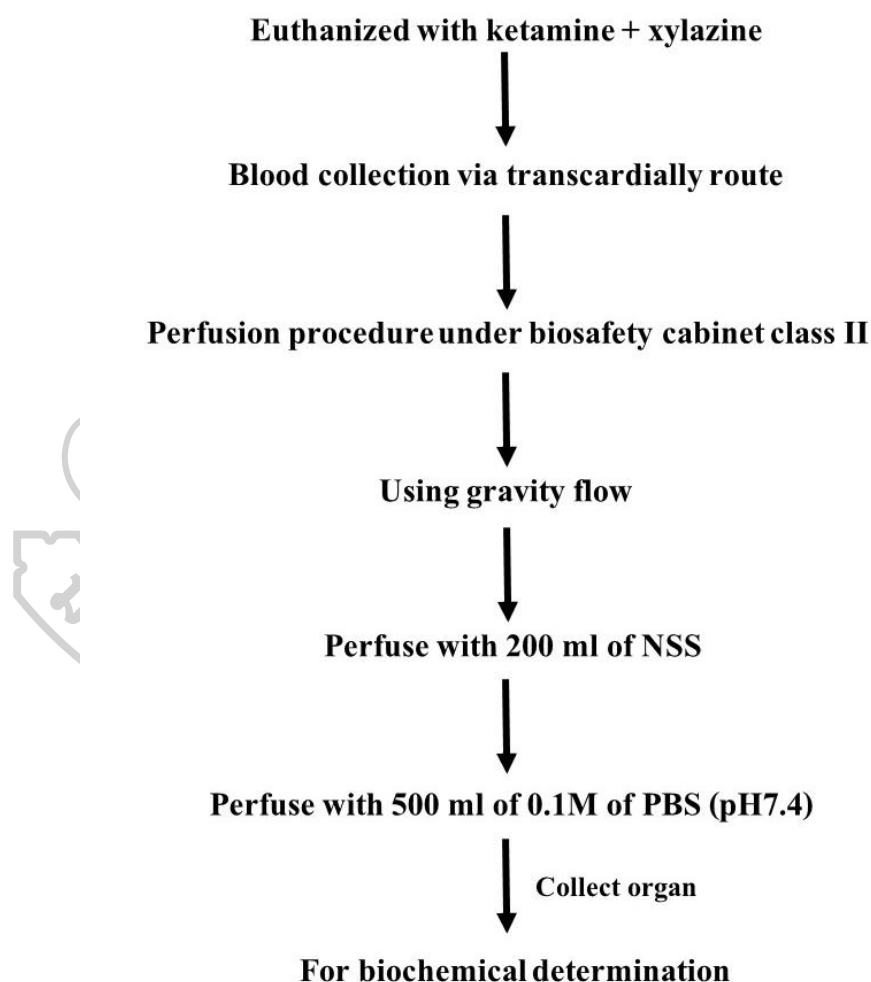
#### 3.11.2 การเก็บตัวอย่างเลือดด้วยวิธี cardiac puncture และ perfusions

หลังจากที่หนูไมซ์ได้รับการ euthanize จะถูกนำไปวางบนแท่นผ่าตัดในลักษณะ ท่านอนหงาย จากนั้นทำการผ่าตัดหนูที่กึ่งกลางของช่องท้องตามแนวช่องอก สอดเข็มเข้าไปที่บริเวณปลายหัวใจเพื่อเก็บเลือด โดยเลือดจะถูกนำไปเข้าปั่นเหวี่ยงในเครื่อง centrifuged ที่ 3,000 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำ supernatant ไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปใช้ต่อไป จากนั้นทำการ Perfusions ด้วยการต่อสายน้ำเกลือเข้าไปที่เข็ม ปล่อยให้สารละลาย PBS 1M pH 7.4 ปริมาณ 1,000 mL เข้าไปตามสายน้ำเกลือให้กระจายไปทั่วร่างกาย และขลิบหัวใจห้องบนขวาเพื่อป้องกัน แรงดันปริมาตรสารเกินในระบบไหลเวียน ดังภาพที่ 12 ขึ้นตอนทั้งหมด ดำเนินการภายใต้ class II biosafety cabinet

### 3.11.3 การเก็บอวัยวะ

ตับ จะถูกตัดไปเก็บรักษาสภาพ โดยล้างอวัยวะด้วย 0.1M of PBS ซึ่งน้ำหนักและวัดขนาดอวัยวะ ถ่ายภาพเพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นนำ ตับ ม้าม ไต ห่อด้วยผ้าก๊อชแบ่งตามกลุ่ม แช่ใน 10% formaldehyde อย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ในการศึกษาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปในระดับจุลพยาธิของสัตว์ทดลอง

#### Perfusions



รูปภาพที่ 12 แผนผังที่ การ Perfusions

### 3.12 การศึกษาความเปลี่ยนแปลง ใน ตับ ของหนูทดลอง

จากการรายงานของ Amit และคณะ ในปี 1995 ว่าปริมาณ hemozoin ในตับและม้าม สัมพันธ์กับ % parasite ในหนูที่ติดเชื้อ *Py*<sup>(60)</sup> แสดงถึงการตายของเซลล์ตับและทำให้เกิดการรวมตัวของ red pulp และ white pulp ในม้าม ส่งผลให้มีการเสียชีวิต<sup>(54)</sup> การสะสมของ hemozoin ในตับและม้ามมีความสัมพันธ์กับการอักเสบของตับและความผิดปกติของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน<sup>(61)</sup> ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในตับและม้ามจึงถูกนำมาศึกษาโดยใช้การย้อมสี H&E

เพื่อศึกษาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปในระดับจุลพยาธิวิทยาของสัตว์ทดลอง เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดลองแล้วหนูทดลองจะถูก euthanize และ perfuse จากนั้น ตับ จะถูกนำมาเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อด้วย 10% paraformaldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการ process ชิ้นเนื้อ โดยการ dehydrated ด้วย ethanal alcohol ที่ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก clearing ด้วย xylene นำเข้าขั้นตอนทำ block paraffin เพื่อตัด section ชิ้นเนื้อวางบนสไลด์ที่ความหนา 6-8 ไมครอน จากนั้นนำไปย้อมสี H&E โดยหลักการย้อมสี H&E เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากสาเหตุทางพยาธิวิทยา สี hematoxylin ติดสีน้ำเงินอมม่วงเข้มบนกรดนิวคลีอิก ในขณะที่สีชมพูของ eosin ติดโปรตีนอย่างไม่เจาะจง<sup>(62)</sup> จากนั้นนำสไลด์ชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อมสี H&E ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตั้งแต่กำลังขยาย 4X จนถึง 100X สังเกตลักษณะที่เปลี่ยนไปของเซลล์ในอวัยวะ และตรวจนับปริมาณ (hemozoin) จากเชื้อ *Py* ด้วยโปรแกรม ImageJ analysis มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

#### 3.12.1 ขั้นตอนการ Process อวัยวะ ตับ

หลังผ่านการ Fixative แล้ว นำเข้ากระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ<sup>(63)</sup>

3.12.1.1 Washing หรือการล้างน้ำยาตรึงสภาพออก โดยใช้ผ้าขาวบางห่อชิ้นเนื้อตัวอย่างแต่ละชิ้น และมัดด้วยเชือกผ้าสีขาวเส้นเล็ก เพื่อป้องกันการโดนกระแสน้ำจากก๊อกโดยตรง เพราะหากชิ้นเนื้อโดนกระแสน้ำที่ไหลจากก๊อกโดยตรง จะทำให้ชิ้นเนื้อเกิดความเสียหายได้ นำชิ้นเนื้อที่ผูกแล้ว มาหย่อนลงในจาน้ำแก้วที่มีน้ำไหลผ่าน เพื่อล้างน้ำยา ออก เนื่องจากน้ำยา Fixative ชนิด formaldehyde 10% จะทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลขึ้นภายในชิ้นเนื้อ ซึ่งไปรบกวนกระบวนการตัด การติดสี เมื่อตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์อาจทำให้แปลผลผิดพลาดได้ จะต้องล้างด้วยการ running water เป็นเวลา 20 นาที

3.12.1.2 Dehydration เมื่อชิ้นเนื้อผ่านการล้างด้วยน้ำก๊อกแล้ว จะทำให้ชิ้นเนื้อมีน้ำอยู่ภายในจำเป็นจะต้องดึงน้ำออก เพื่อเตรียมชิ้นเนื้อให้สาร Embedding

media ซึมผ่านเข้าไปได้ จึงต้องใช้สารที่มีคุณสมบัติดึงน้ำออกได้ และสารที่นิยมใช้เป็น dehydrant โดยทั่วไป คือ Ethyl alcohol โดยจะทำการแช่ในสาร dehydrant จากความเข้มข้นน้อยไปมาก คือ

3.12.1.3 Clearing คือ การนำสารที่มีคุณสมบัติสามารถเข้ามาแทนที่ dehydrant ได้ และเป็นตัวกลางให้ embedding media แทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ เรียกว่า clearing agent ในที่นี้ จะใช้สาร Xylene

3.12.1.4. เมื่อผ่านขั้นตอน Clearing แล้ว จึงนำมา Infiltration ด้วยวิธีการดังนี้

Paraffin 1 เป็นเวลา 10 นาที

Paraffin 2 เป็นเวลา 10 นาที

Paraffin 3 เป็นเวลา 10 นาที

3.12.1.5 จากนั้น จะนำชิ้นเนื้อดับที่ผ่านการ Infiltrate แล้ว มาวางในแม่พิมพ์ (mold) เพื่อหล่อบล็อกชิ้นเนื้อดับให้แข็งพอที่จะนำไปตัดด้วยเครื่อง Microtome

3.12.1.5.1 วางชิ้นเนื้อดับ โดยให้หน้าตัดชิ้นเนื้อดับขนานไปกับแม่พิมพ์

3.12.1.5.2 เท paraffin เหลว ลงไปในแม่พิมพ์ (mold) โดยระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ และไม่ให้มีฝุ่นตกลงไปในแม่พิมพ์ ขณะที่กำลังหล่อบล็อก paraffin

3.12.1.5.3 เมื่อเท paraffin เหลวจนเต็มแม่พิมพ์แล้ว ปล่อยให้เย็นลง จนจะแข็งตัวเต็มที่

3.12.1.5.4 เมื่อ paraffin เหลวแข็งเต็มที่แล้ว จึงแกะบล็อกออกจากแม่พิมพ์ เพื่อนำไปตัด section ต่อไป

3.12.1.6 การตัดบล็อกชิ้นเนื้อ

3.12.1.6.1 เมื่อแกะบล็อกชิ้นเนื้อดับออกจากแม่พิมพ์แล้ว นำมา Trim เพื่อตัดเอา paraffin ส่วนเกินที่อยู่รอบข้างชิ้นเนื้อออกให้ได้มากที่สุด ควร trim ให้เป็นรูปทรงสี่เหลี่ยม จะทำให้ section ติดกันเป็น ribbon



3.12.1.6.2 นำบล็อกชิ้นเนื้อดับที่ได้ มายึดกับที่ยึดตัวอย่างในเครื่อง Microtome ให้แน่นพอที่จะไม่หลุดขณะทำการตัด section และปรับหน้าบล็อกให้ขนาดกับความคมของใบมีด

3.12.1.6.3 ปรับความหนาของ section บนเครื่อง Microtome ไปที่ 6° เพื่อไม่ให้หนาจนเกินไปจนตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ลำบาก และไม่ใบบางเกินไป จนตัด section ออกมาไม่ได้

3.12.1.6.4 เช็บบนเครื่องที่จะใช้ตัด section หากเป็นใบมีดเก่าที่มีคนใช้แล้ว ควรทำการเปลี่ยนใบมีดใหม่ก่อนใช้งาน

3.12.1.6.5 ควรปรับมุมความคมใบมีดให้ได้ 27° - 32°

3.12.1.6.6 จากนั้น เริ่มการตัด section โดยตัดให้ความเร็วสม่ำเสมอ และลงน้ำหนักให้ใกล้เคียงกันทุกครั้ง จะทำให้ได้ section ที่มีความบางเสมอกันทั้งแผ่น

3.12.1.6.7 นำ section ที่ตัดได้ มาติดลงบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ Hotplate แทน water bath

3.12.1.6.8 วางแผ่นสไลด์ลงบน hotplate ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 40°C

3.12.1.6.9 หยดน้ำที่ผสม albumin ลงไปให้เกาะบนสไลด์ในลักษณะคล้ายหยดน้ำบนใบบัว

3.12.1.6.10 จากนั้นนำ section ไปวางบนน้ำ ให้ section ค่อยๆ คลี่ย ออกจนตั้ง อาจจะใช้ฟู่กันช่วยในการคลี่ยออกของ section ได้

3.12.1.6.11 เมื่อ section คลี่ยตัวออกเต็มที่แล้ว จึงนำแผ่นสไลด์ออกจาก hotplate และนำมาผึ่งให้แห้ง ก่อนจะนำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 60°C เพื่อละลาย paraffin ที่อยู่ในเนื้อเยื่อดับออก

3.12.1.6.12 จากนั้นจึงนำไปย้อมสี

### 3.12.2 ขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin & Eosin

สีที่ใช้ย้อมเนื้อเยื่อดับในงานวิจัยชิ้นนี้ ใช้สี Hematoxylin & Eosin โดยใช้เทคนิค Harris's hematoxylin & eosin

### 3.12.2.1 วิธีการเตรียมสี hematoxylin โดยใช้เทคนิค Harris's hematoxylin & eosin

Hematoxylin crystal	8 g.
95% ethyl alcohol	80 mL
Aluminum ammonium sulfate	160 g
น้ำกลั่น	1,600 mL
Mercuric oxide	6 g

ละลายสาร Aluminum ammonium sulfate ลงในน้ำกลั่น โดยการให้ความร้อน จากนั้นเติม Hematoxylin crystal ที่ละลายใน 95% ethyl alcohol ลงไป ต้มให้ร้อนที่ 95°C แล้วยกออกจากเตา ค่อยๆเติม Mercuric oxide พร้อมกับคนไปด้วย จะได้สารละลายสีม่วงดำ และแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที ปล่อยให้เงินกระทั่งสารละลายเย็นตัวลง แล้วจึงกรองเก็บไว้ในขวดสีชา ก่อนนำมาใช้ จะต้องทำการกรองสารละลายก่อนทุกครั้ง

### 3.12.2.2 วิธีการเตรียมสี eosin โดยใช้เทคนิค Harris's hematoxylin & eosin

สี eosin เป็นสี counter stain ที่ใช้ย้อมทับ หลังจากย้อมสี hematoxylin แล้ว โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับ basic tissue โดยเฉพาะโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดสีชมพูแกมแดง เมื่อตรวจดูชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วย eosin จะทำให้เห็นไซโตพลาสซึมเป็นสีชมพูแกมแดง

#### 1% stock alcohol eosin

Eosin Y	1 g
น้ำกลั่น	20 mL
95% alcohol	80 mL
ละลาย Eosin Y ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม 95% alcohol ลงไป	

#### Working eosin solution

Eosin stock solution	1 ส่วน
80% alcohol	3 ส่วน

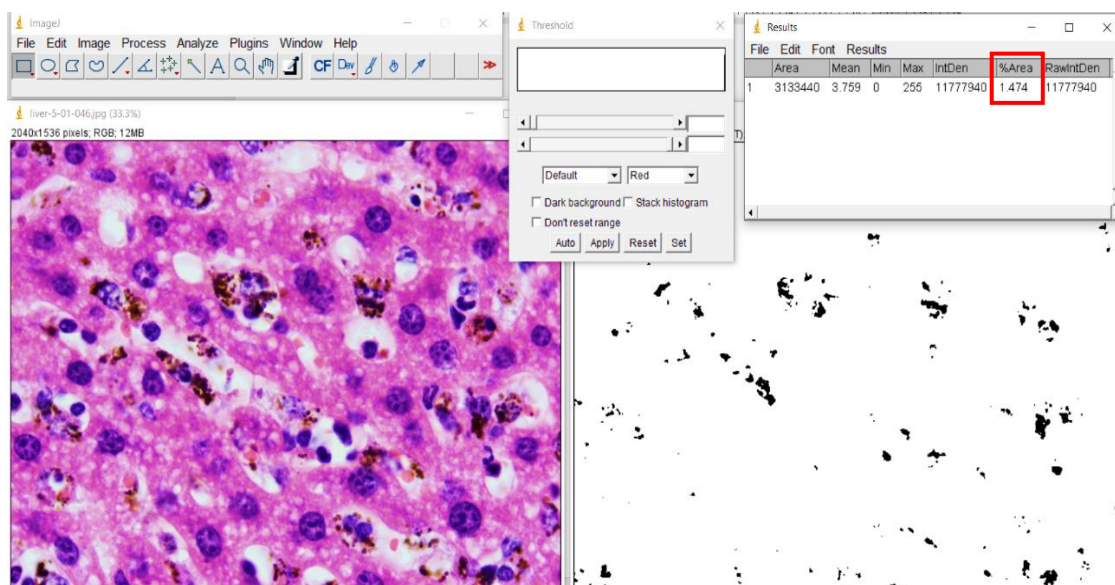
ก่อนนำไปใช้งาน เติม glacial acetic 0.5 mL ใน 100 mL ของสี แล้วคนให้เข้ากัน

1 Xylene 5 นาที	2 Xylene 5 นาที	3 Absolute 5 นาที	4 95% alc. 5 นาที	5 80% alc. 5 นาที
6 ล้างน้ำ 5 นาที	7 Hematoxylin 5 นาที	8 ล้างน้ำ 5 นาที	9 จุ่มกรด 2 - 3 จุ่ม	10 ล้างน้ำ 5 นาที
11 ammonia 5 นาที	12 ล้างน้ำ 5 นาที	13 70% alc. 5 นาที	14 eosin 5 นาที	15 95% alc. 5 นาที
16 95% alc. 5 นาที	17 Absolute 5 นาที	18 Absolute 5 นาที	19 Xylene 5 นาที	20 Xylene 5 นาที
21 Xylene 5 นาที	22 Xylene 5 นาที	นำไป ปิดแผ่น Cover slip	ตรวจดู ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์	

รูปภาพที่ 13 ผังการย้อมสี Harris's hematoxylin & eosin

### 3.13 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในอวัยวะ ตับ ของสัตว์ทดลอง

การหาปริมาณฮีโมโซอินในตับ จะใช้การวิเคราะห์จากหนูจำนวน 3 ตัวในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทำโดยการเลือกภาพถ่ายจากการย้อม H&E อย่างสุ่ม ที่กำลังขยาย 100X มาจำนวน 5 ภาพ (239.89 x 180.62 mm<sup>2</sup> /photo) นำมาวิเคราะห์หาปริมาณฮีโมโซอินด้วยโปรแกรม image J โดยใช้เมมูนับจำนวนพิกเซลขาวดำของโปรแกรม พื้นที่สีดำของ hemozoin จะถูกคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ภาพ ดังภาพที่ 14



รูปภาพที่ 14 การวิเคราะห์ค่า hemozoin ตับ โดยใช้ซอฟต์แวร์ ImageJ พื้นที่ % (กรอบสีแดง) แสดงค่าเฉลี่ยของ hemozoin ในภาพถ่ายต่อพื้นที่ 239.89 x 180.62 mm<sup>2</sup> โดย % hemozoin คำนวณจากภาพถ่าย 5 ภาพ ต่อหนู 1 ตัว และนำมาวิเคราะห์หา % hemozoin เฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม

### 3.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใน โปรแกรม SPSS Statistics Version 18.0 โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบ ความแตกต่างระหว่างกลุ่มประกอบด้วย กลุ่มควบคุม กลุ่มติดเชื่อมาลาเรียพลาสโมเดียมโยอีไล กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระท่อม และกลุ่มที่ได้รับยาต้านมาลาเรียมาตรฐานในหนูไมซ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) นอกจากนี้ ยังใช้การเปรียบเทียบ % Hematocrit ก่อนและหลังการทดลองในหนูไมซ์กลุ่มเดียวกัน โดยใช้การทดสอบ Student's t – test ซึ่งพิจารณาความแตกต่างที่มีนัยสำคัญที่ค่า  $p < 0.05$



## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรีย *Py* โดยศึกษาอัตราการมีชีวิตรอด (Survival rate and time) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณความเข้มข้นเม็ดเลือดแดง (Hematocrit) หนูทดลอง ปริมาณการติดเชื้อที่เม็ดเลือดแดง (Parasitemia) การเปลี่ยนแปลงทางลักษณะพื้นฐานวิทยา (Morphology) และจุลกายวิภาค (Histology) ของตับ รวมถึงปริมาณการสะสมของ Hemozoin ภายในอวัยวะตับ ในหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรีย *Py* โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองที่เป็นหนูปกติและได้รับการรักษา รายงานผลดังนี้

#### 4.1 อัตราการรอดชีวิต (Survival rate and time)

หนูทุกกลุ่มได้รับการสังเกตและบันทึกอัตราการรอดชีวิตทุกวันเป็นเวลา 8 วัน หลังมีการติดเชื้อ *Py* โดยแสดงอัตราการรอดชีวิตเป็นปริมาณร้อยละเปอร์เซ็นต์ (%) ต่อวัน โดยแสดงผลดังตารางที่ 3

จากภาพที่ 15 จะเห็นได้ว่ากลุ่ม Sham, Sh-MS75, Sh-MS150 มีอัตราการรอดชีวิต 100 % จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่กลุ่ม *Py* หนูเริ่มเสียชีวิตในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อ จากนั้นเสียชีวิตทั้งหมดในวันที่ 6 ของการทดลอง

กลุ่ม *Py*-ART มีหนูเสียชีวิตในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองหนูมีอัตราการรอดชีวิตที่ 80%

กลุ่ม *Py*-MS75 มีหนูเริ่มเสียชีวิตในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อ และมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองหนูมีอัตราการรอดชีวิตที่ 40%

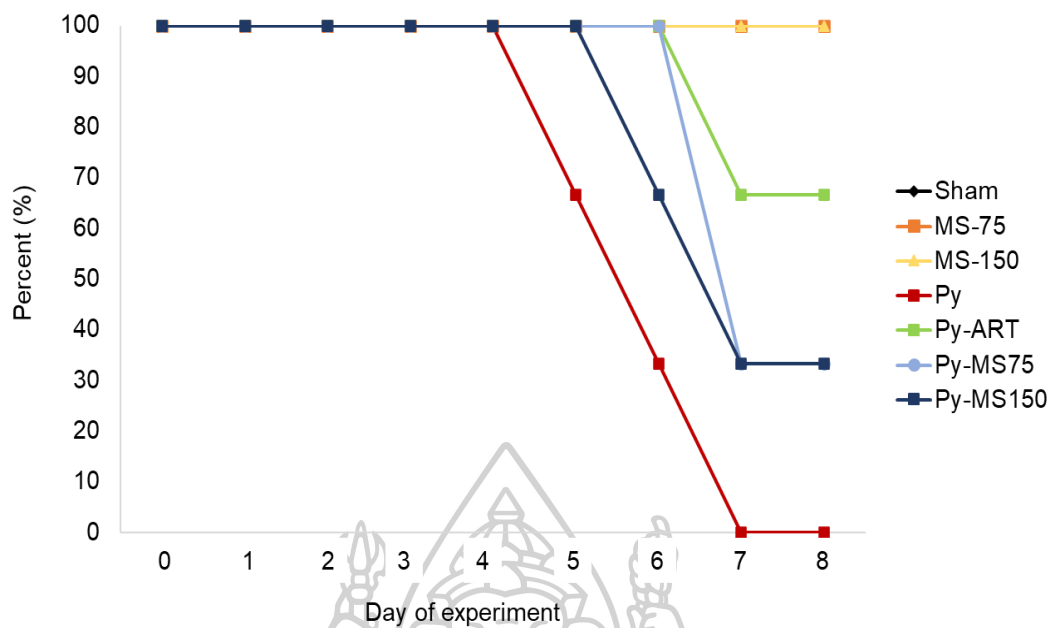


กลุ่ม Py-MS150 มีหนูเริ่มเสียชีวิตในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อ และมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองหนูมีอัตราการรอดชีวิตที่ 40%

ดังนั้นการติดเชื้อ Py อาจส่งผลให้หนูไม่ช้ช่ายสั้น ทำให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตในหนูที่ติดเชื้อ Py ซึ่งหนูไม่ช้ช่ายกลุ่ม Py-MS75 และ หนูไม่ช้ช่ายกลุ่ม Py-MS150 มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่ากลุ่ม Py ใกล้เคียงกับอัตราการรอดชีวิตของหนูไม่ช้ช่ายกลุ่ม Py-ART ที่ได้รับการรักษาด้วยยา Artesunate ผลของการให้สารสกัดจากใบกระท่อมในหนูไม่ช้ช่ายที่ติดเชื้อมาลาเรีย Py สามารถยืดอายุขัยและลดอัตราการเสียชีวิตของหนูที่ติดเชื้อ Py ได้

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการรอดชีวิตของหนูไม่ช้ช่ายหลังได้รับเชื้อมาลาเรีย Py ในแต่ละกลุ่ม (n=5) ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 8 (สิ้นสุดการทดลอง)

Day	Groups (n=5)						
	Non-infected			Infected			
	Sham	Sh-Ms75	Sh-Ms150	Py	Py-ART	Py-Ms75	Py-Ms150
Day 0	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Day 1	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Day 2	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Day 3	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Day 4	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Day 5	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Day 6	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	2 (40%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)
Day 7	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	Die (0%)	4 (80%)	3(60%)	3 (60%)
Day 8	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)		4 (80%)	2(40%)	2 (40%)



รูปภาพที่ 15 เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต และเวลาการรอดชีวิตของหนูในแต่ละกลุ่มของการทดลอง

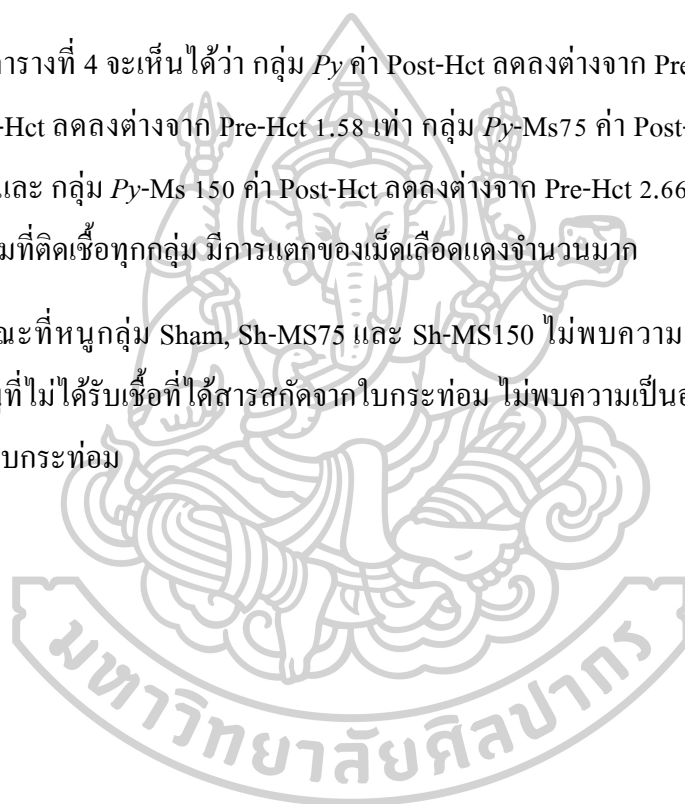


#### 4.2 ปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (Hematocrit)

หนูทดลองทุกกลุ่มถูกเก็บเลือดจากหางเพื่อบันทึก Hematocrit (Hct) ตั้งต้นเป็นร้อยละเปอร์เซ็นต์(%) เรียกว่า Pre-Hct หลังจากนั้น จากนั้น ตรวจเช็คด้วยการเก็บเลือดจากปลายหางหนูก่อนที่จะเหนี่ยวนำให้หนูติดเชื้อ *Py* ซึ่งเรียกว่า Hct ก่อนการติดเชื้อ หลังการติดเชื้อ *Py* เก็บเลือดจากปลายหางหนูเพื่อตรวจเช็คระดับ Hct เรียกว่า Hct หลังการติดเชื้อ การเปรียบเทียบ Hct ของหนูไมซ์ทั้ง 5 กลุ่มถูกแสดงในตารางที่ 4 และเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของ Hct ในแต่ละกลุ่มแสดงเป็นกราฟในภาพที่ 16

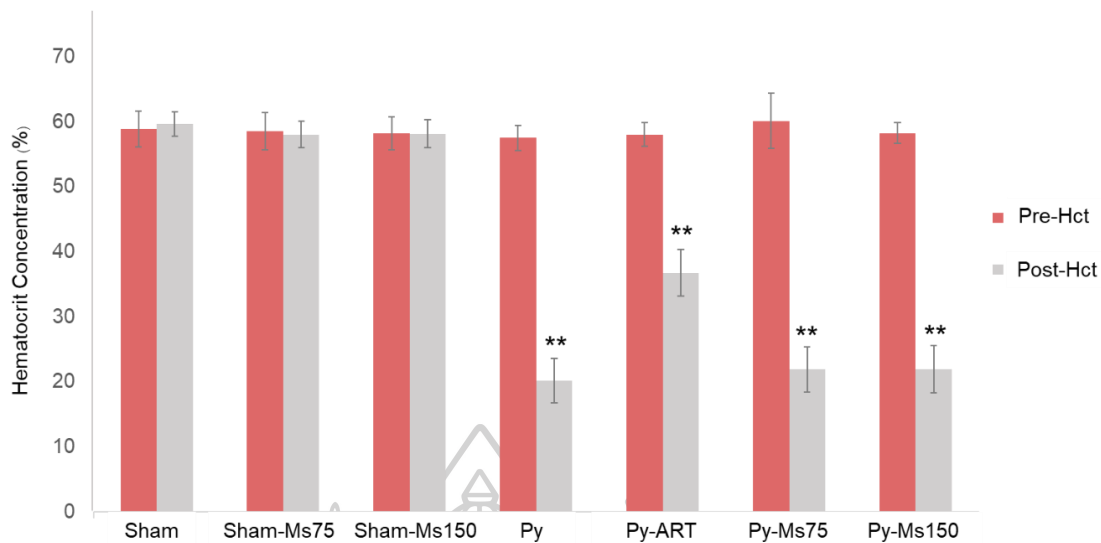
จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่า กลุ่ม *Py* ค่า Post-Hct ลดลงต่างจาก Pre-Hct 2.85 เท่า กลุ่ม *Py-ART* ค่า Post-Hct ลดลงต่างจาก Pre-Hct 1.58 เท่า กลุ่ม *Py-MS75* ค่า Post-Hct ลดลงต่างจาก Pre-Hct 2.75 เท่า และ กลุ่ม *Py-MS 150* ค่า Post-Hct ลดลงต่างจาก Pre-Hct 2.66 เท่า บ่งบอกได้ว่า เลือดของหนูในกลุ่มที่ติดเชื้อทุกกลุ่ม มีการแตกของเม็ดเลือดแดงจำนวนมาก

ในขณะที่หนูกลุ่ม Sham, Sh-MS75 และ Sh-MS150 ไม่พบความแตกต่างของค่า Hct บ่งบอกได้ว่า หนูที่ไม่ได้รับเชื้อที่ได้สารสกัดจากใบกระท่อม ไม่พบความเป็นอันตรายต่อเม็ดเลือดแดงจากสารสกัดใบกระท่อม



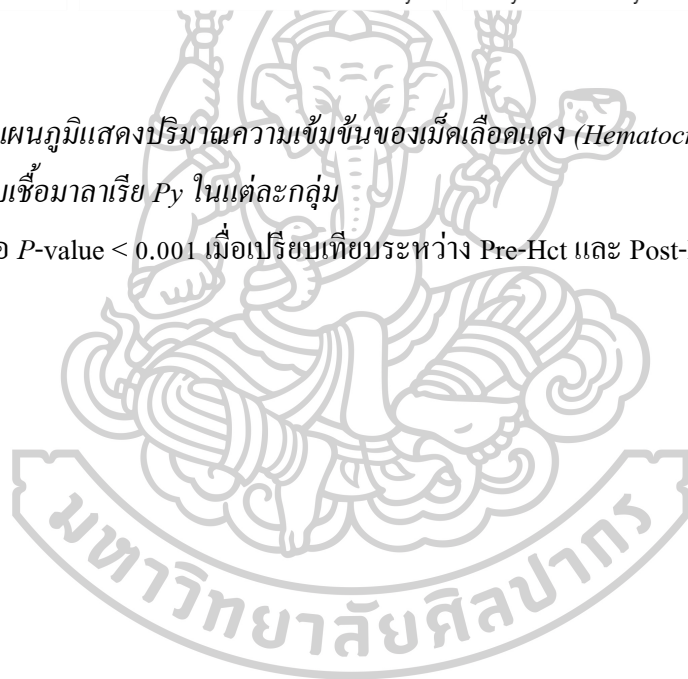
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (Hematocrit) ของหนูไมซ์ ก่อนและหลังได้รับเชื้อมาลาเรีย *Py* ในแต่ละกลุ่ม ( $n=5$ )

Group	Hct (%)	No. mice					Mean $\pm$ SD	Pair t-test P-value
		1	2	3	4	5		
Sham	Pre-Hct	62.50	58.00	55.00	60.00	59.00	<b>58.90 <math>\pm</math> 2.75</b>	0.40
	Post-Hct	61.20	58.50	57.80	62.10	58.50	<b>59.62 <math>\pm</math> 1.90</b>	
Sham-Ms75	Pre-Hct	62.50	60.00	57.00	58.00	55.00	<b>58.50 <math>\pm</math> 2.87</b>	0.50
	Post-Hct	61.20	58.70	57.50	56.30	56.50	<b>58.04 <math>\pm</math> 2.01</b>	
Sham-Ms150	Pre-Hct	57.00	57.00	62.50	56.00	58.50	<b>58.20 <math>\pm</math> 2.56</b>	0.92
	Post-Hct	55.40	56.80	61.00	58.40	59.00	<b>58.12 <math>\pm</math> 2.14</b>	
<i>Py</i>	Pre-Hct	57.00	55.00	58.50	60.20	56.80	<b>57.50 <math>\pm</math> 1.95</b>	< 0.001
	Post-Hct	25.40	21.00	20.20	17.40	16.80	<b>20.16 <math>\pm</math> 3.43</b>	
<i>Py</i> -ART	Pre-Hct	57.00	60.00	55.50	59.50	58.20	<b>58.04 <math>\pm</math> 1.84</b>	< 0.001
	Post-Hct	42.50	34.00	33.33	36.45	37.50	<b>36.76 <math>\pm</math> 3.64</b>	
<i>Py</i> -Ms75	Pre-Hct	66.00	54.50	58.50	60.20	61.50	<b>60.14 <math>\pm</math> 4.20</b>	< 0.001
	Post-Hct	27.70	22.50	20.00	19.50	19.70	<b>21.88 <math>\pm</math> 3.47</b>	
<i>Py</i> -Ms150	Pre-Hct	57.50	60.00	56.50	59.80	57.50	<b>58.26 <math>\pm</math> 1.55</b>	< 0.001
	Post-Hct	27.74	22.50	19.50	21.50	18.40	<b>21.93 <math>\pm</math> 3.63</b>	



รูปภาพที่ 16 แผนภูมิแสดงปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (Hematocrit) ของหนูไมซ์ ก่อน และหลังได้รับเชื้อมาลาเรีย Py ในแต่ละกลุ่ม

\*\* คือ  $P$ -value < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Pre-Hct และ Post-Hct

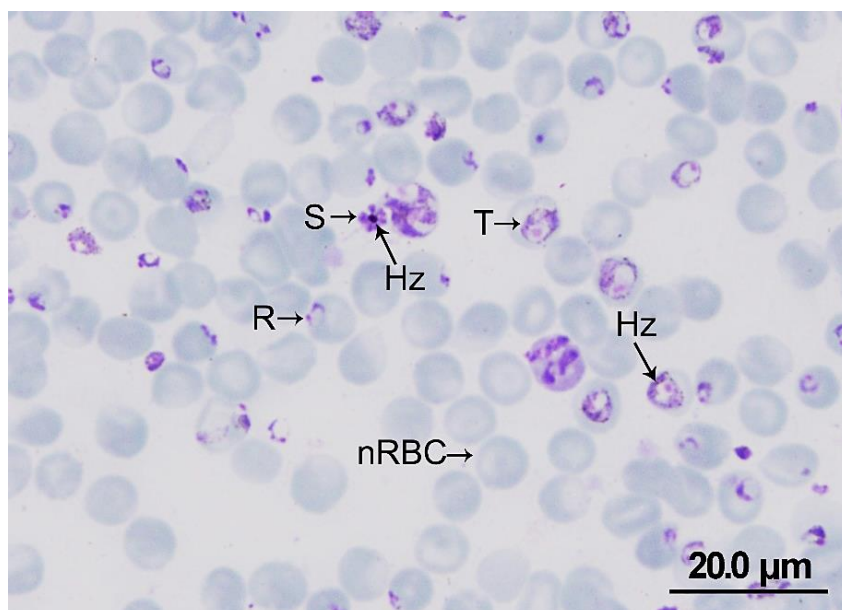


### 4.3 ปริมาณการติดเชื้อที่เม็ดเลือดแดง (Parasitemia)

หนูทดลองทุกกลุ่มจะถูกติดตามการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงและปริมาณการติดเชื้อมาลาเรีย *Py* ในเม็ดเลือดแดงทุกวัน โดยการเก็บเลือดจากหางของหนูไมซ์ จากนั้นนำไปย้อมด้วยเทคนิค Giemsa staining ถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อและคำนวณแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ Parasitemia

จากรูปที่ 17 แสดงลักษณะของ RBCs ที่ปกติและ RBCs ที่ติดเชื้อ ซึ่งมี 3 ระยะ ได้แก่ ; ring, trophozoite และ schizont เมื่อเชื้อมาลาเรียเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง (RBCs) จะเจริญต่อไปเป็นระยะ trophozoite โดยในระยะแรกจะมีรูปร่างเป็นวงกลมหรือวงรี เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa จะเห็นรูปร่างคล้ายกับวงแหวน ส่วนไซโทพลาสซึมติดสีน้ำเงินและส่วนของนิวเคลียสติดสีม่วง ส่วนตรงกลางเป็นวงไม่ติดสี จะเรียกระยะแรกนี้ว่า ระยะวงแหวน (ring stage) เชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงย่อยสลายฮีโมโกลบินเพื่อเป็นอาหาร และปล่อยผลผลิตสุดท้ายรวมถึงฮีโมโกลบินที่ย่อยสลายไม่สมบูรณ์ออกมาในรูปแบบ crystalline hemozoin หรือ malaria pigments มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาลทองหรือสีน้ำตาลดำ จะพบรงควัตถุสีน้ำตาลชัดเจนในระยะ growing trophozoite และในระยะนี้เชื้อจะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโทพลาสซึมเดิมทำให้เกิดระยะ schizont ซึ่งมีนิวเคลียสจำนวนมาก เมื่อ schizont เจริญเต็มที่จะมีการแบ่งไซโทพลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียว กลายเป็นระยะ mature schizont ซึ่งมีเซลล์ภายในเรียกว่า merozoite เมื่อเม็ดเลือดแดงแตก merozoite จะออกมาเป็นอิสระในกระแสเลือดชั่วคราวและพร้อมเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่เจริญเป็นระยะต่าง ๆ ซ้ำเป็นวัฏจักร





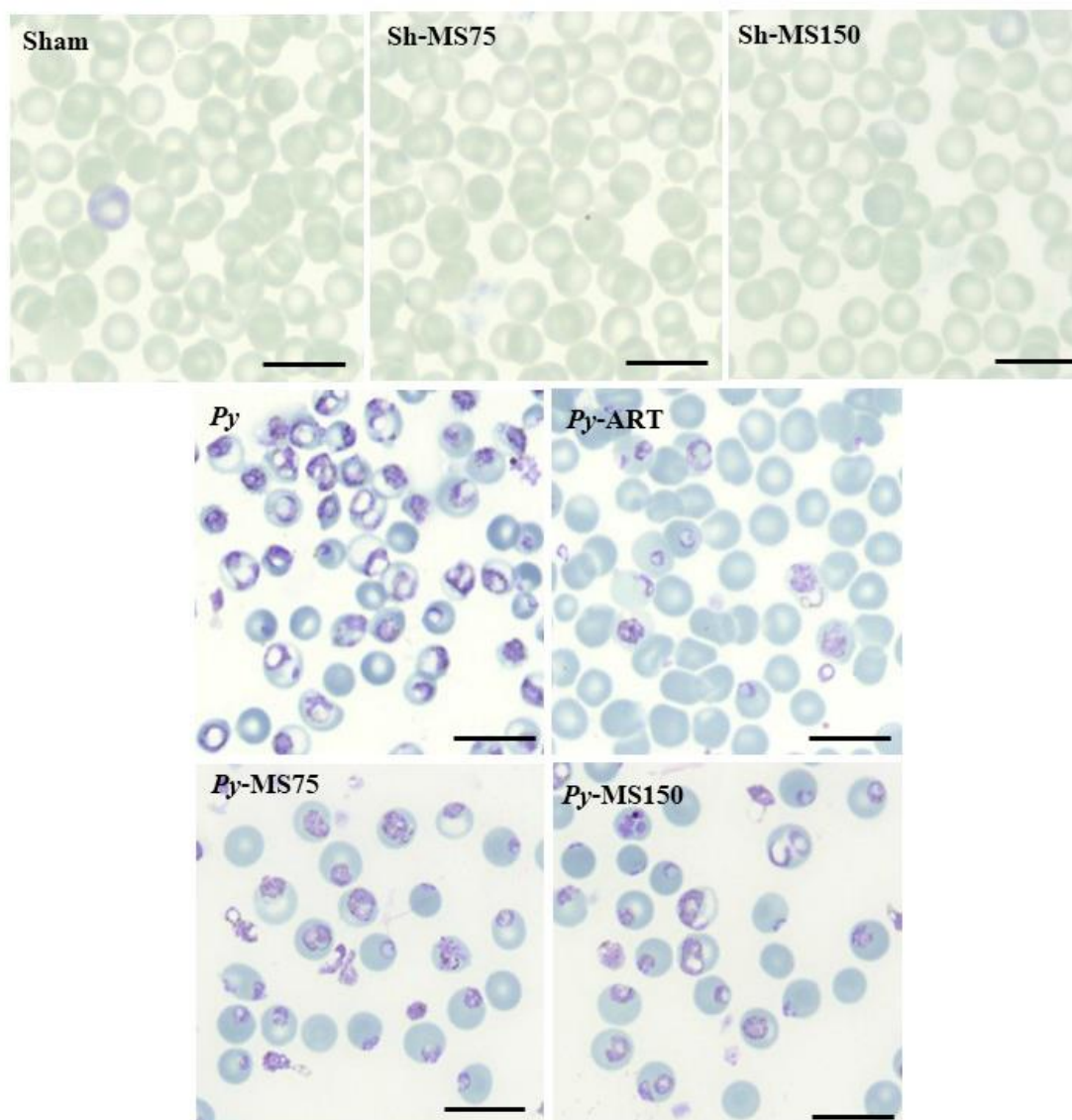
รูปภาพที่ 17 ภาพแสดงรูปถ่าย Thin blood smear จากหนูที่ได้รับเชื้อ Py ถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยสัญลักษณ์ Normal Red Blood Cell (nRBC) คือ เม็ดเลือดแดงปกติ, และแสดงสัญลักษณ์ระยะการเติบโตของเชื้อปรสิต Py ตามลำดับดังนี้ ระยะ Ring (R) stage, ระยะ Trophozoite (T) stage, และระยะ Schizont (S) stage เชื้อมาลาเรีย Py ใช้ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงเพื่อการเจริญเติบโต

รูปที่ 18 แสดงลักษณะการติดเชื้อของ RBCs ในแต่ละกลุ่ม โดยไม่พบการติดเชื้อในกลุ่ม Sham, Sh-MS75 และ Sh-MS150 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ส่วนในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ Py พบการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงระยะต่างๆ โดยกลุ่ม Py พบการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษา และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา Artesunate พบการติดเชื้อน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกระท่อม คือกลุ่ม Py-MS75 และกลุ่ม Py-MS150

% parasitemia คำนวณ ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 8 หลังการติดเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 5 นอกจากนี้ ในภาพที่ 19 ได้แสดง% parasitemia ของหนูกลุ่มที่ติดเชื้อ Py

ภาพที่ 19 จากกราฟแสดงให้เห็นว่ากลุ่ม Py มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งสูงที่สุดในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อ สังเกตอัตราการเสียชีวิตของกลุ่ม Py พบว่าเริ่มเสียชีวิตในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อ จากนั้นหนูทดลองในกลุ่ม Py เสียชีวิตทั้งหมดในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อ

ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา artesunate และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระท่อม พบว่า ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นช้ากว่ากลุ่ม *Py* ซึ่งในกลุ่ม *Py-ART* ปริมาณเชื้อเพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อ ส่วนในกลุ่ม *Py-MS75*, *Py-MS150* ปริมาณเชื้อเพิ่มอย่างช้า ๆ และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อ



**รูปภาพที่ 18** ภาพถ่าย *Thin blood smear* ของหนูในแต่ละกลุ่ม ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ ในวันที่ 6 หลังการติดเชื้อ ที่กำลังขยาย 100 เท่า มาตรฐานส่วน 20  $\mu\text{m}$



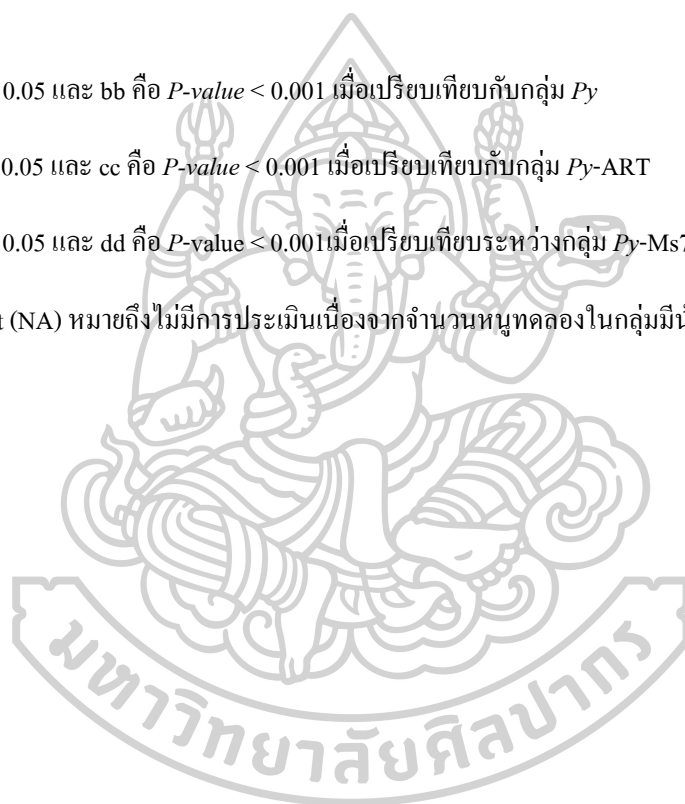
<b>D7</b>	<b>0.00±0.00</b>	<b>0.00±0.00</b>	<b>0.00±0.00</b>	<b>Die</b>	<b>9.10±1.88</b>	<b>67.96±2.78</b>	<b>67.1±4.74</b>
<sup>b</sup> P-value	-	-	-	-	NA	NA	NA
<sup>c</sup> P-value	-	-	-	-	-	NA	NA
<sup>d</sup> P-value	-	-	-	-	-	-	NA
<b>D8</b>	<b>0.00±0.00</b>	<b>0.00±0.00</b>	<b>0.00±0.00</b>	<b>Die</b>	<b>3.20±1.28</b>	<b>68.45±0.78</b>	<b>65.80±1.13</b>
<sup>b</sup> P-value	-	-	-	-	NA	NA	NA
<sup>c</sup> P-value	-	-	-	-	-	NA	NA
<sup>d</sup> P-value	-	-	-	-	-	-	NA

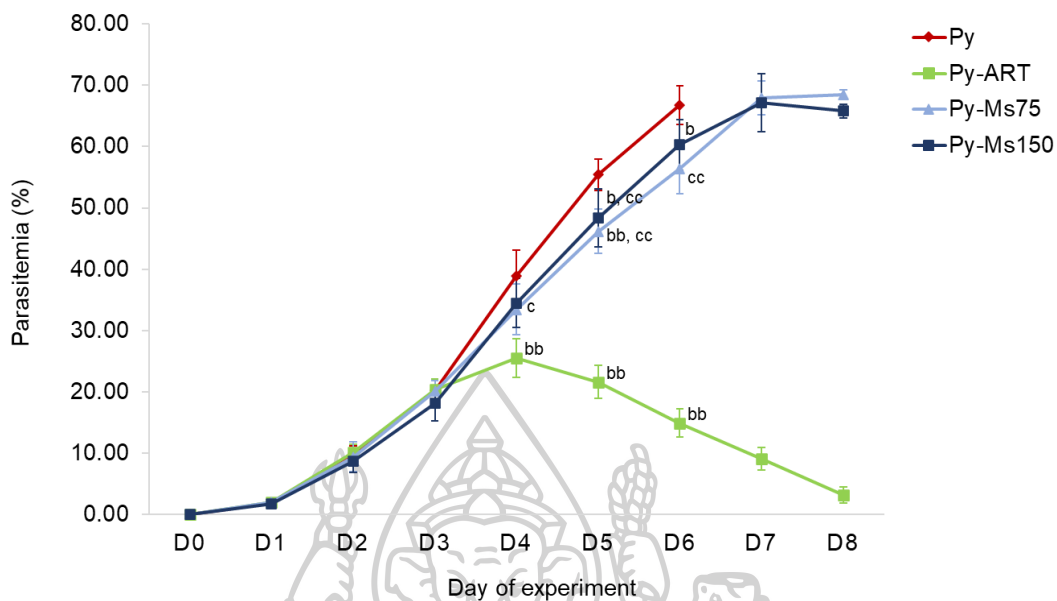
b คือ  $P\text{-value} < 0.05$  และ bb คือ  $P\text{-value} < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Py

c คือ  $P\text{-value} < 0.05$  และ cc คือ  $P\text{-value} < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Py-ART

d คือ  $P\text{-value} < 0.05$  และ dd คือ  $P\text{-value} < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Py-Ms75 และ Py-Ms150

Non assessment (NA) หมายถึง ไม่มีการประเมินเนื่องจากจำนวนหนูทดลองในกลุ่มมีน้อยกว่า 2 ตัว ( $n < 2$ )



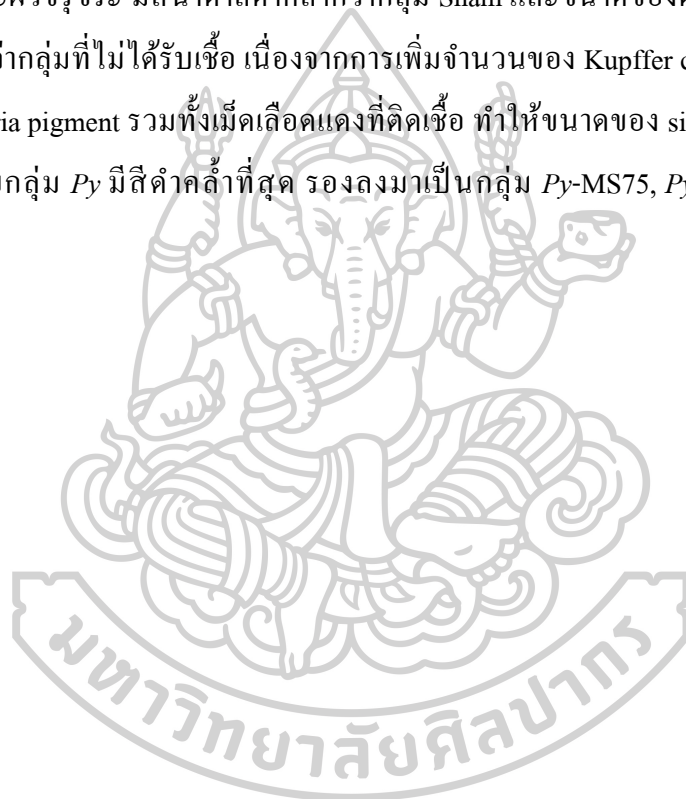


รูปภาพที่ 19 กราฟแผนภูมิ %parasitemia เปรียบเทียบท่ามกลางกลุ่มหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรีย Py ทั้งหมด 4 กลุ่ม แสดงข้อมูลเป็น Mean  $\pm$  SEM (%) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ ANOVA ในรูปแบบของ Tukey's test พิจารณาค่าความต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $P$ -value  $< 0.05$  b คือ  $P$ -value  $< 0.05$  และ bb คือ  $P$ -value  $< 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Py c คือ  $P$ -value  $< 0.05$  และ cc คือ  $P$ -value  $< 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Py-ART

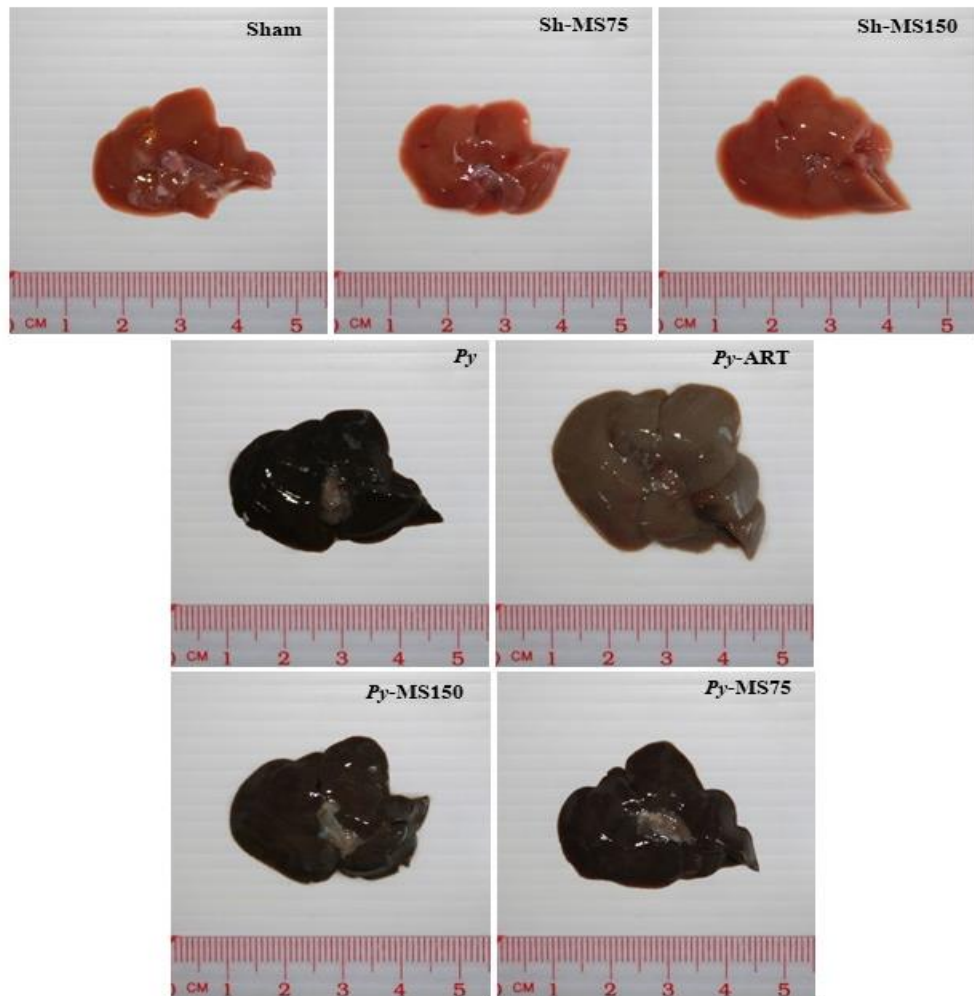
#### 4.4 การเปลี่ยนแปลงทางลักษณะสัณฐานวิทยาของตับ (Morphology)

หลังสิ้นสุดการทดลอง หนูทดลองทุกตัวจะถูก euthanize และ perfuse จากนั้นเก็บอวัยวะเพื่อนำมาศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสี H&E วิเคราะห์ปริมาณเฮโมไซอินในตับโดยใช้โปรแกรม ImageJ.

รูปที่ 20 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตับ และลักษณะเฉพาะของแต่ละกลุ่ม ในกลุ่ม Sham ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตับ จะมีสีน้ำตาลอมแดงมีสีที่สดและพื้นผิวเรียบ ในขณะที่กลุ่ม Py จะลักษณะผิวขรุขระ มีสีน้ำตาลดำคล้ำกว่ากลุ่ม Sham และขนาดของตับในกลุ่มที่ติดเชื้อจะมีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของ Kupffer cell และ histiocyte ที่มาเก็บกิน malaria pigment รวมทั้งเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ทำให้ขนาดของ sinusoid ขยายออกและมีเลือดคั่ง โดยกลุ่ม Py มีสีคล้ำที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่ม Py-MS75, Py-MS150 และ Py-ART ตามลำดับ







รูปภาพที่ 20 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตับเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม



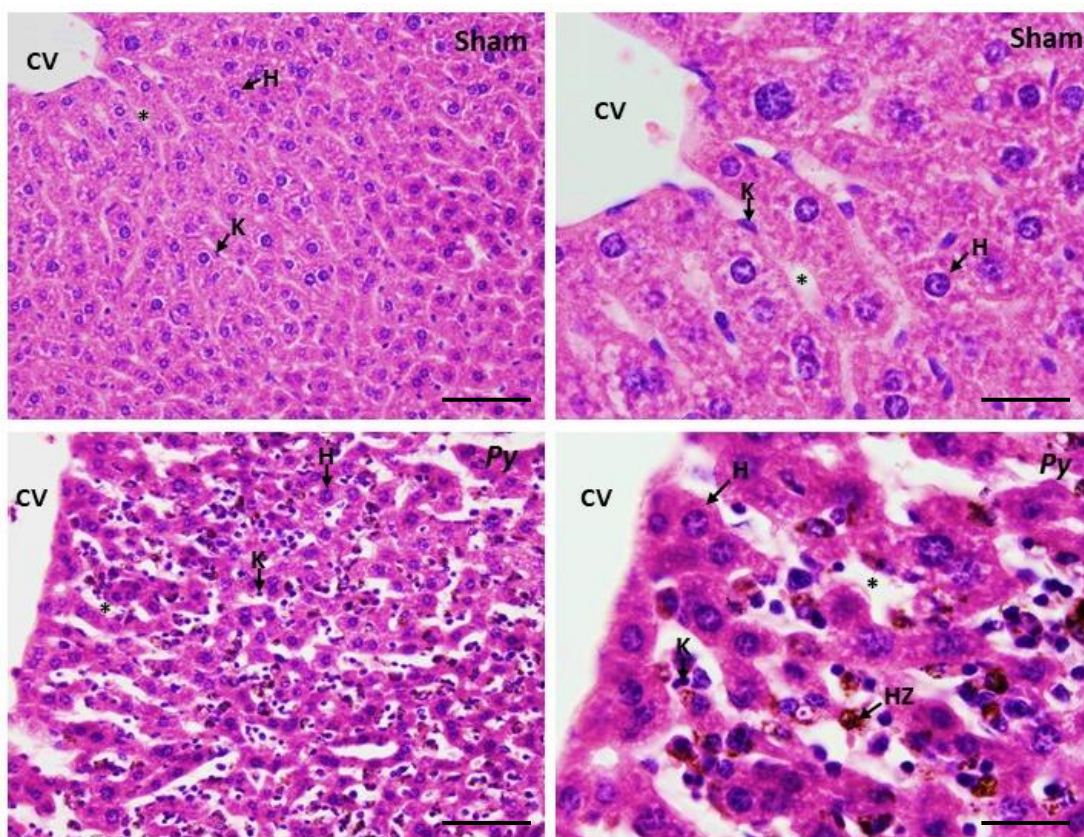
#### 4.5 การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาค (Histology) ของตับ

##### จุลพยาธิวิทยาและการสะสมของฮีโมโซอินในตับ

รูปที่ 21 แสดงการเปรียบเทียบจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับระหว่างกลุ่ม Sham และกลุ่ม Py ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่ม Sham ประกอบด้วย central vein, hepatocyte, hepatic sinusoidal, และ Kupffer cell โดย central vein คือหลอดเลือดดำตั้งอยู่ที่บริเวณตรงกลาง hepatic lobule มี sinusoid เป็นหลอดเลือดฝอย ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนสารระหว่างเลือดกับเซลล์ตับ เลือดใน sinusoid เป็นเลือดที่มาจาก portal vein และ hepatic artery การไหลของเลือดใน sinusoid จะไหลไปในทิศทางเดียว เข้าสู่ central vein และออกจากตับผ่าน hepatic vein ไปยัง inferior vena cava ใน sinusoid จะพบ Kupffer cell ในบางแห่ง ซึ่งทำหน้าที่เป็น phagocyte จับเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุ หรือมีความผิดปกติ เซลล์ตับ (hepatocyte) มีรูปร่างหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสหนึ่งหรือสองนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง hepatocyte อยู่เรียงต่อกันเป็นแถว มีลักษณะซ้อนกันเป็นแผ่นเรียกว่า liver cell plate ส่วนในเนื้อเยื่อตับของกลุ่ม Py แสดงให้เห็น การแตกของ hepatocyte พบเซลล์ตับตาย sinusoid มีการขยายตัวใหญ่ขึ้น พบ Kupffer cell ภายในมีการคั่งของ hemozoin เป็นจำนวนมาก

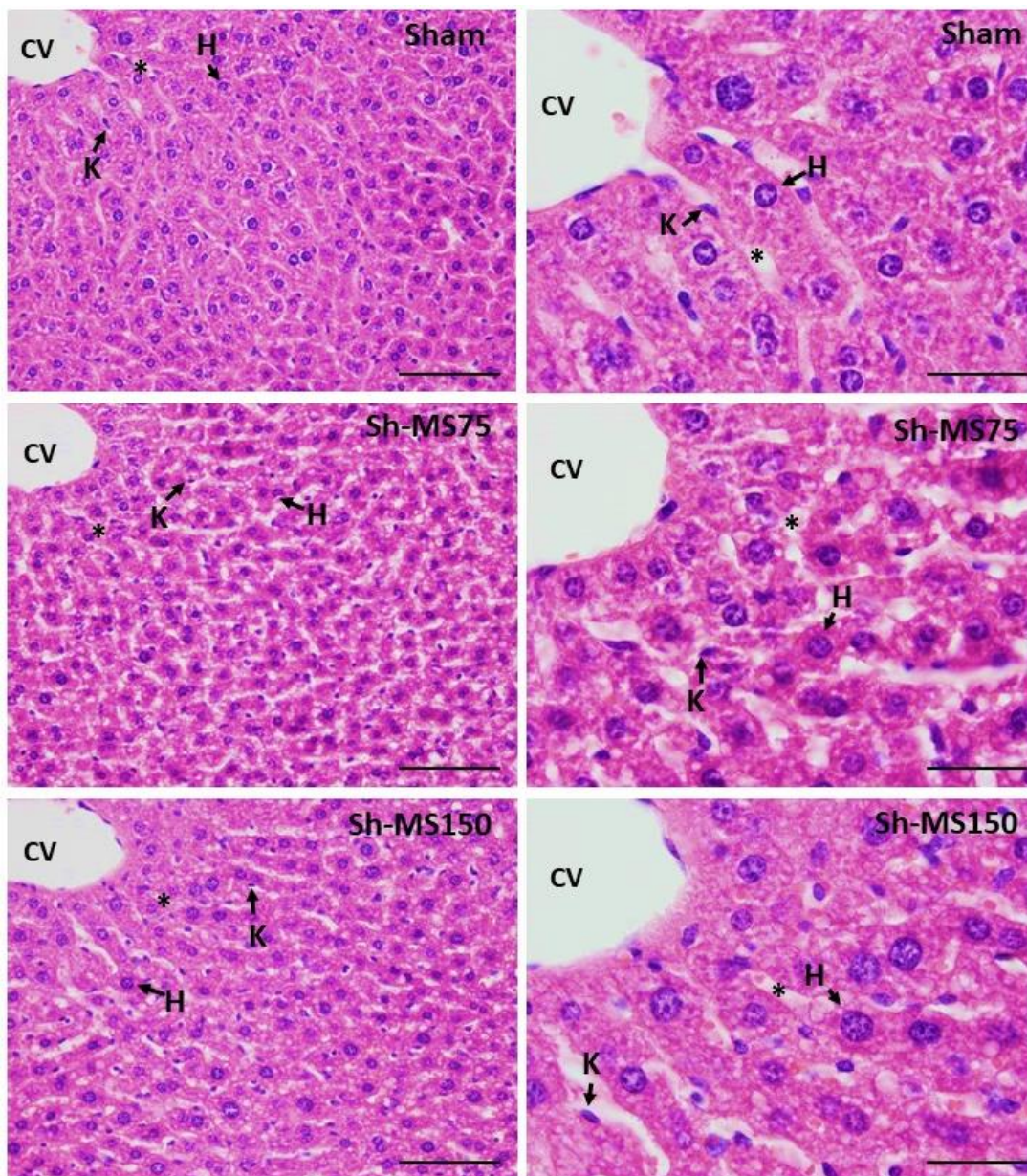
รูปที่ 22 แสดงการเปรียบเทียบจุลพยาธิสภาพตับของกลุ่ม Sham, Sh-MS75 และ Sh-MS150 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ Py ประกอบด้วย central vein, hepatocyte, hepatic sinusoidal, และ Kupffer cell ไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อทั้งสามกลุ่ม

รูปที่ 23 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในกลุ่มติดเชื้อ Py ที่ได้รับการรักษาด้วยยา Artesunate คือกลุ่ม Py-ART และกลุ่มติดเชื้อที่ได้รับสารสกัดจากใบกระท่อม คือกลุ่ม Py-MS75, Py-MS150 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา คือกลุ่ม Py โดยภาพด้านซ้ายมีกำลังขยาย 40X และภาพด้านขวามีกำลังขยาย 100X จากบริเวณเดียวกัน พบว่า ทั้ง 3 กลุ่ม มี hemozoin สะสมอยู่ภายใน Kupffer cell มีการขยายตัวของ sinusoid และพบว่าเซลล์ตับมีการจัดเรียงตัวผิดปกติ โดยเฉพาะในกลุ่ม Py-MS150 ที่พบการสะสมของ hemozoin มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาอื่น แต่อย่างน้อยกว่ากลุ่ม Py



รูปภาพที่ 21 เปรียบเทียบจุลพยาธิวิทยาของตับในกลุ่ม Sham และกลุ่ม Py โดยการย้อมสี H&E (คอลัมน์ซ้าย): กำลังขยาย 40X มาตรฐาน 50  $\mu\text{m}$ , (คอลัมน์ขวา): กำลังขยาย 100X มาตรฐาน 20  $\mu\text{m}$ , CV: Central vein, H: hepatocyte, K: Kupffer cell, (\*): sinusoid, HZ: เม็ดสี hemozoin



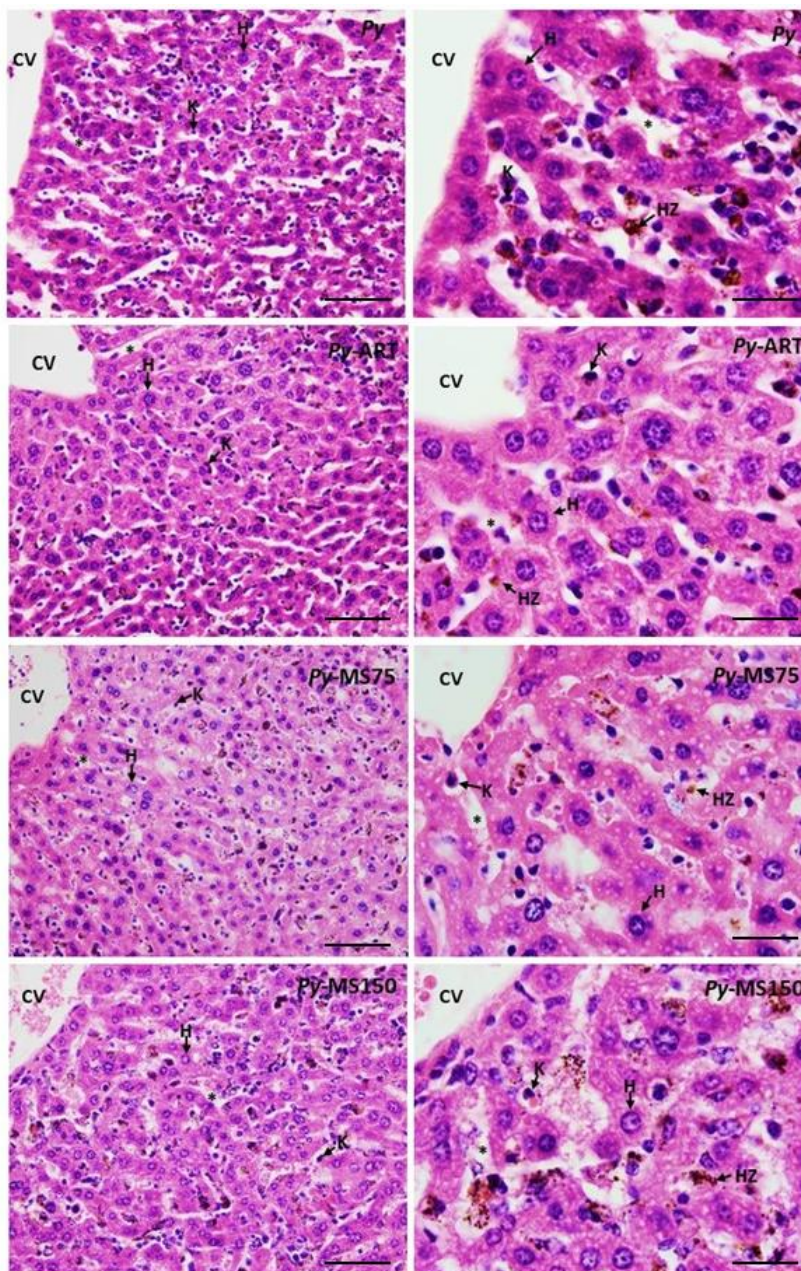


รูปภาพที่ 22 เปรียบเทียบจุลพยาธิวิทยาของตับในกลุ่ม Sham, Sh-MS75 และ Sh-MS150 โดยการย้อมสี H&E

(คอลัมน์ซ้าย): กำลังขยาย 40X มาตรฐาน 50  $\mu\text{m}$  , (คอลัมน์ขวา): กำลังขยาย 100X มาตรฐาน 20  $\mu\text{m}$

CV: Central vein, H: hepatocyte, K: Kupffer cell, (\*): sinusoid, Hz: เม็ดสี hemozoin





รูปภาพที่ 23 เปรียบเทียบจุดพยาธิวิทยาของตับในกลุ่มที่ได้รับการรักษา เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา ได้แก่กลุ่ม Py-ART, Py-MS75 และ Py-MS150 โดยการย้อมสี H&E (คอลัมน์ซ้าย): กำลังขยาย 40X มาตรฐาน 50  $\mu\text{m}$  , (คอลัมน์ขวา): กำลังขยาย 100X มาตรฐาน 20  $\mu\text{m}$ , CV: Central vein, H: hepatocyte, K: Kupffer cell, (\*): sinusoid, HZ: เม็ดสี hemozoin

#### 4.6 ปริมาณการสะสมของ Hemozoin ภายในตับ

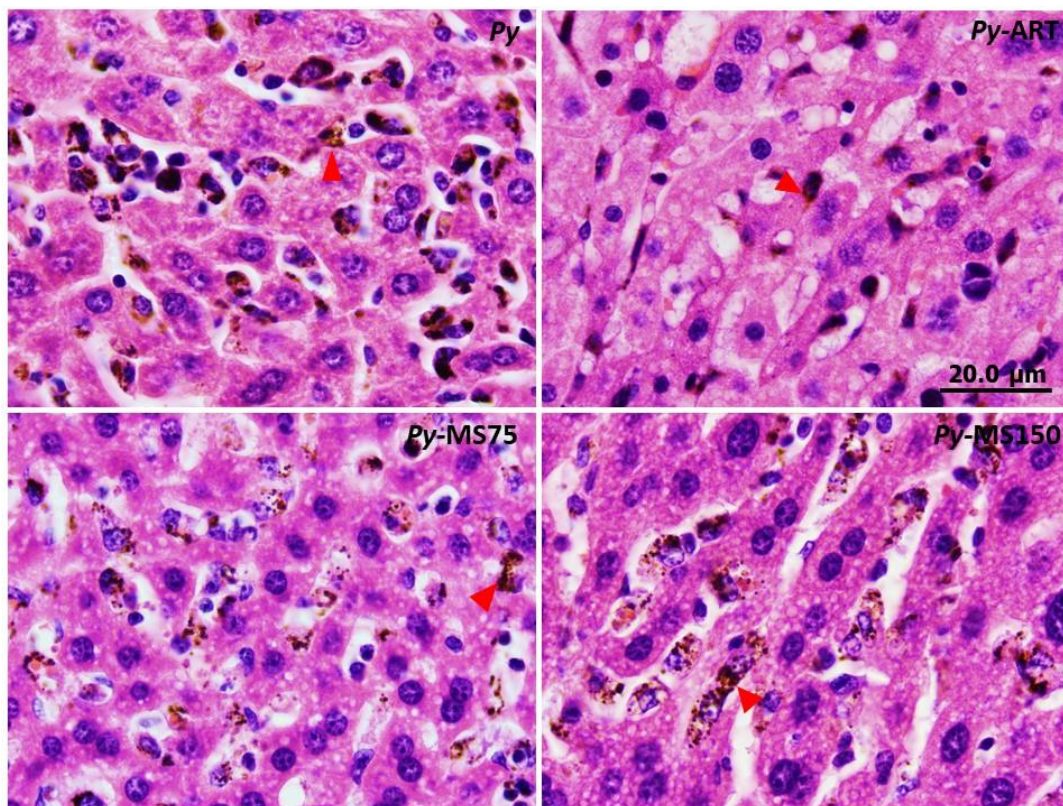
Malaria pigment เป็นรงควัตถุสีน้ำตาลดำ มีชื่อเรียกเฉพาะว่า hemozoin เกิดจากการย่อยฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรียแล้วเหลือเป็นของเสียสีน้ำตาลดำ เมื่อเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเกิดการแตก เศษต่าง ๆ รวมถึง hemozoin จะกระจายออกมาในพลาสมา และถูก macrophage จำนวนมากจับกิน จำนวนของ hemozoin มีบทบาทสำคัญในการแสดงถึงพยาธิสภาพที่รุนแรงในอวัยวะ ตับ ม้าม ไต ของผู้ป่วย ดังนั้น ปริมาณ hemozoin ของกลุ่มที่มีการติดเชื้อ *Py* จึงถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ImageJ ดังแสดงในรูปที่ 14

เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของ hemozoin ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อ *Py* ทั้ง 4 กลุ่ม และกลุ่ม Sham แสดงในตารางที่ 6

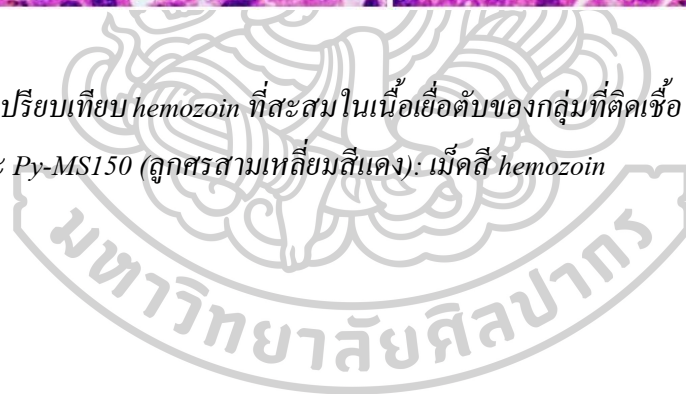
ในกลุ่ม Sham, Sh-MS75 และ Sh-MS150 ไม่พบ hemozoin ในกลุ่มที่ติดเชื้อ *Py* ทั้งหมด มี % hemozoin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.001$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Sham กลุ่ม *Py* มี % hemozoin สูง  $2.40 \pm 0.38$  % สังกัดกลุ่ม *Py*-ART, *Py*-MS75 และ *Py*-MS150 มีค่า hemozoin ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.001$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม *Py* โดยกลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้ง 3 กลุ่ม คือกลุ่ม *Py*-ART, *Py*-MS75 และ *Py*-MS150 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่ากลุ่ม *Py* ที่  $1.20 \pm 0.22$ ,  $2.02 \pm 0.21$  และ  $2.10 \pm 0.36$  ตามลำดับ







รูปภาพที่ 24 เปรียบเทียบ hemozoin ที่สะสมในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มที่ติดเชื้อ Py ได้แก่ Py, Py-ART, Py-MS75 และ Py-MS150 (ลูกศรสามเหลี่ยมสีแดง): เม็ดสี hemozoin



ตารางที่ 6 ปริมาณการสะสมของ Hemozoin ในเนื้อเยื่อตับ (% hemozoin ต่อ  $239.89 \times 180.62 \text{ mm}^2$  ของพื้นที่รูปภาพ) เปรียบเทียบท่ามกลางกลุ่มหนูทดลองที่ปกติกับกลุ่มหนูที่ติดเชื้อมาลาเรีย Py และกลุ่มที่ได้รับการรักษา แสดงข้อมูลเป็น Mean  $\pm$  SEM (%) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ ANOVA ในรูปแบบของ Tukey's test พิจารณาค่าความต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $P\text{-value} < 0.05$

N mice	Group				
	Sham	Py	Py-ART	Py-Ms75	Py-Ms150
1	0.00 $\pm$ 0.00	2.44 $\pm$ 0.33	1.24 $\pm$ 0.21	2.04 $\pm$ 0.17	1.90 $\pm$ 0.44
2	0.00 $\pm$ 0.00	2.29 $\pm$ 0.43	1.03 $\pm$ 0.21	2.03 $\pm$ 0.17	2.24 $\pm$ 0.32
3	0.00 $\pm$ 0.00	2.46 $\pm$ 0.45	1.33 $\pm$ 0.17	2.00 $\pm$ 0.3	2.16 $\pm$ 0.27
<b>Hemozoin (%)</b>	<b>0.00 <math>\pm</math> 0.00</b>	<b>2.40 <math>\pm</math> 0.38</b>	<b>1.20 <math>\pm</math> 0.22</b>	<b>2.02 <math>\pm</math> 0.21</b>	<b>2.10 <math>\pm</math> 0.36</b>
<b>Fold changes to the Py group (%)</b>	-	<b>100.00</b>	<b>49.98</b>	<b>84.44</b>	<b>87.60</b>
<i>p</i> -value <sup>a</sup>	-	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>p</i> -value <sup>b</sup>	-	-	< 0.001	0.003	0.030
<i>p</i> -value <sup>c</sup>	-	-	-	< 0.001	< 0.001
<i>p</i> -value <sup>d</sup>	-	-	-	-	0.940

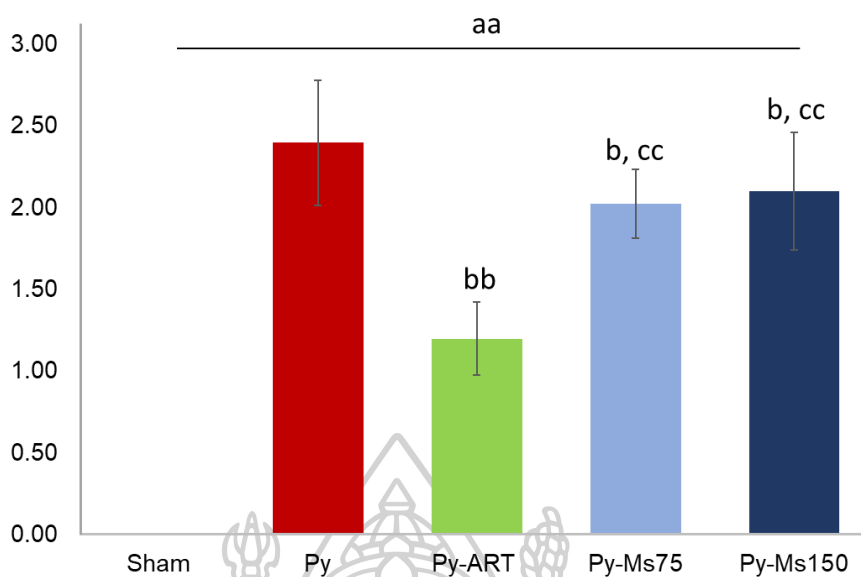
a คือ  $P\text{-value} < 0.05$  และ aa คือ  $P < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham

b คือ  $P\text{-value} < 0.05$  และ bb คือ  $P < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Py

c คือ  $P\text{-value} < 0.05$  และ cc คือ  $P < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Py-ART

d คือ  $P\text{-value} < 0.05$  และ dd คือ  $P\text{-value} < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Py-Ms75 และ Py-Ms150





รูปภาพที่ 25 กราฟแสดงข้อมูล % hemozoin ในตับ (percentage /239.89 x 180.62 mm<sup>2</sup> area) ซึ่งสัมพันธ์กับผลของกลุ่ม Py จากนั้นเปรียบเทียบระหว่าง 7 กลุ่มของการทดลอง

a คือ  $P$ -value < 0.05 และ aa คือ  $P$  < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham

b คือ  $P$ -value < 0.05 และ bb คือ  $P$  < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Py

c คือ  $P$ -value < 0.05 และ cc คือ  $P$  < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Py-ART

d คือ  $P$ -value < 0.05 และ dd คือ  $P$ -value < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Py-Ms75 และ Py-

Ms150

## บทที่ 5

### สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผล

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรีย *Py* โดยได้ทำการศึกษาอัตราการมีชีวิตรอด (Survival rate and time) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณความเข้มข้นเม็ดเลือดแดง(Hematocrit) ในหนูทดลอง ปริมาณการติดเชื้อที่เม็ดเลือดแดง (Parasitemia) การเปลี่ยนแปลงทางลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology) และจุลกายวิภาค (Histology) ของตับ รวมถึงปริมาณการสะสมของ Hemozoin ภายในอวัยวะตับ ในหนูไม่ซึ่ติดเชื้อมาลาเรีย *Py* โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองที่เป็นหนูปกติและได้รับการรักษาสรุปผลการทดลอง ดังนี้

หลังสิ้นสุดการทดลอง พบว่า หนูทดลองในกลุ่ม Sham, Sh-MS75, Sh-MS150 มีอัตราการรอดชีวิต 100 % ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *Py* เริ่มมีการเสียชีวิตในวันที่ 5 สอดคล้องกับการรายงานของ Fu และคณะ (2012)<sup>(54)</sup> ว่าหนูที่ติดเชื้อมาลาเรีย *Py* มีการเสียชีวิตในระหว่าง 5-9 วันหลังติดเชื้อ สิ่งที่น่าสนใจคือในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกระท่อม มีอัตราการเสียชีวิตช้ากว่ากลุ่ม *Py* ที่ไม่ได้รับการรักษาเลย โดยในกลุ่ม *Py*-MS150 เริ่มเสียชีวิตในวันที่ 6 ของการทดลอง และในกลุ่ม *Py*-MS75 เริ่มเสียชีวิตในวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยามาตรฐาน คือกลุ่ม *Py*-ART อาจเป็นไปได้ว่าคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ของสารสกัดจากใบกระท่อม<sup>(64)</sup> ช่วยยับยั้งการสร้างพรอสตาแกลนดิน(PGE2) ซึ่งเป็นสารที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเมื่อเกิดกระบวนการอักเสบ โดยมีผลเข้าไปยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส 2 (cyclooxygenase 2; COX2) ที่อยู่ในกระบวนการ จึงเป็นผลให้มีการยับยั้งกระบวนการอักเสบได้ อย่างไรก็ตาม แม้สารสกัดจากใบกระท่อมจะสามารถต้านการอักเสบ บรรเทาอาการไข้ที่เกิดจากพิษเชื้อมาลาเรีย แต่ในผลการศึกษาจากเลือด พบว่า กลุ่มหนู

ที่คิดเชื่อยังคงมีการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองหาปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง(Hematocrit) ในตารางที่ 4 และภาพที่ 16 โดยพบว่า หนูในกลุ่ม Sham ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า Hct ก่อนและหลังการทดลอง นอกจากนี้ในกลุ่ม Sh-MS75 และ Sh-MS150 ที่ได้สารสกัดจากใบกระท่อม ไม่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของค่า Hct อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาของ Singh และคณะ<sup>(46)</sup> ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของพืชกระท่อม ทางห้องปฏิบัติการทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิกของเลือด (hematological and clinical-chemistry parameters) ในผู้ใช้พืชกระท่อมจำนวน 55 รายเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงจำนวน 19 ราย โดยใช้สารไมทราจินีนปริมาณ 76.3-114.8 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่าผลการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการของผู้ใช้พืชกระท่อมส่วนใหญ่อยู่ในช่วงค่าปกติมีค่าไม่แตกต่างจากอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรง ดังนั้นสารสกัดจากใบกระท่อมในปริมาณที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จึงไม่ได้เป็นอันตรายต่อเม็ดเลือดแดง ในทางตรงกันข้าม กลุ่มที่คิดเชื่อทุกกลุ่มผลทางสถิติพบการเปลี่ยนแปลงของค่า Hct อย่างมีนัยสำคัญ บ่งบอกได้ว่ามีการแตกของเม็ดเลือดแดงจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับผล parasitemia ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะกลุ่ม Py ที่ไม่ได้รับการรักษาเลย อย่างไรก็ตามในกลุ่ม Py-ART แม้จะกำจัด parasite ได้ดีที่สุดแต่ก็มีการลดลงของ Hct เทียบกับก่อนอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นไปได้ว่า ยา artesunate อาจมีผลทำให้มีภาวะ anemia ในระหว่างกระบวนการ metabolite ของยาที่เกิด oxidative stress ใน pRBCs<sup>(65)</sup>

แม้ในกลุ่มหนูทดลองที่คิดเชื่อและได้รับสารสกัดจากใบกระท่อมจะมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มคิดเชื่อที่ไม่ได้รับการรักษาเลย แต่ปริมาณการติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง (Parasitemia) ของหนูที่คิดเชื่อที่ได้รับสารสกัดจากใบกระท่อม กลับไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ (ตารางที่ 5) ยกเว้นกลุ่ม Py-ART ที่ได้รับการรักษาด้วยยามาตรฐาน ที่มีปริมาณการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 19) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากกระท่อมไม่มีผลในการรักษาโรคมมาลาเรียโดยตรง แต่มีส่วนช่วยในการรอดชีวิตของหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม โยอีไล

ผลจากการศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของตับ พบความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อและกลุ่มที่ได้รับเชื้อ (ภาพที่ 20) โดยเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า จะพบว่าลักษณะของตับในกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ จะมีสีน้ำตาลแดงสด ในขณะที่ลักษณะตับของกลุ่มที่ได้รับเชื้อจะมีสีน้ำตาลดำที่เกิดจากการมี malaria pigment เป็นจำนวนมากและมีขนาดใหญ่กว่าตับของ

กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนและขนาดของ Kupffer cell และ Histiocyte ที่มาเก็บกิน malaria pigment รวมถึงเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ เศษต่าง ๆ sinusoid มีการขยายตัว มีเลือดคั่งในตับ ทำให้ตับมีขนาดที่ใหญ่และมีน้ำหนักมากขึ้น<sup>(38)</sup> นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของตับในกลุ่มที่ติดเชื้อด้วยกัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากใบกระท่อม คือ Py-MS75 และ Py-MS150 มีลักษณะและสีที่ใกล้เคียงกับกลุ่ม Py และ กลุ่ม Py-ART ที่ได้รับการรักษาด้วยยามาตรฐานมีสีน้ำตาลดำจางลง บ่งบอกได้ว่า กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา มีการลดลงของจำนวน malaria pigment ซึ่งเมื่อนำมาเทียบกับผลการศึกษากายวิภาคศาสตร์ทาง histology ของตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่า ในกลุ่ม Py ขนาดของ sinusoid มีการขยายออกอย่างเห็นได้ชัด มีการตายของเซลล์ตับ พบ Kupffer cell จำนวนมากที่ภายในมีการคั่งของ hemozoin ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่ม Sham อย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 21) ในขณะที่กลุ่ม Py-ART ที่ได้รับการรักษาด้วยยามาตรฐาน พบว่าพยาธิสภาพของตับแม้จะมีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยใบกระท่อม ซึ่งอาจเป็นผลข้างเคียงจากการใช้ยาอาทิสูเนทที่มีผลทำให้ตับเกิดการอักเสบได้<sup>(66)</sup> พบการสะสมของ hemozoin ไม่มาก ซึ่งหากรักษาจนหายดี พยาธิสภาพของตับจะสามารถกลับมาเป็นปกติได้โดยไม่เหลือร่องรอยหากไม่มีโรคแทรกซ้อน<sup>(38)</sup> สิ่งที่น่าสนใจคือ พยาธิสภาพในกลุ่ม Py-MS75 และ Py-MS150 พบการสะสมของ hemozoin ที่น้อยกว่ากลุ่ม Py (ภาพที่ 23) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันในเชิงสถิติจะทำให้เห็นผลที่ชัดเจนขึ้น ดังในตารางที่ 6 พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากใบกระท่อม มี %hemozoin ที่  $2.02 \pm 0.21$  และ  $2.10 \pm 0.36$  ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม Py ที่มี %hemozoin สูงถึง  $2.40 \pm 0.38$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น แม้กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากใบกระท่อม จะมี % hemozoin ที่สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาจากยามาตรฐาน artesunate แต่ก็มี % hemozoin ที่ต่ำกว่ากลุ่ม Py ที่ไม่ได้รับการรักษาเลย อาจเป็นผลจากคุณสมบัติด้านการอักเสบของพืชกระท่อม อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในการศึกษาครั้งนี้ คือ ระยะเวลาในการทดลองมีระยะที่สั้น เพียง 8 วัน ก่อนทำการเก็บอวัยวะ หากต้องการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบกระท่อมเพื่อเปรียบเทียบกับยาด้านมาลาเรียมาตรฐานให้มากกว่านี้ ควรใช้ระยะเวลาที่ยาวขึ้น และควรมีการศึกษาในกลุ่มที่ใช้ยาด้านมาลาเรียมาตรฐานร่วมกับสารสกัดจากใบกระท่อมด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า ผลของสารสกัดใบกระท่อม ปริมาณ 75 มก/กก. ให้ผลการทดลองที่ค่อนข้างดีกว่าปริมาณ 150 มก/กก. ดังจะเห็นได้จากผลการศึกษาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของ hemozoin ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อ Py ทั้ง 4 กลุ่ม และกลุ่ม Sham (ตารางที่ 6) เมื่อสังเกตค่า hemozoin ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.001$ ) ของกลุ่ม Py-ART, Py-MS75 และ Py-MS150 เมื่อ

เปรียบเทียบกับกลุ่ม Py จะพบว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้ง 3 กลุ่ม คือกลุ่ม Py-ART, Py-MS75 และ Py-MS150 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่ากลุ่ม Py ที่  $1.20 \pm 0.22$ ,  $2.02 \pm 0.21$  และ  $2.10 \pm 0.36$  ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกระท่อมปริมาณ 75 มก/กก. ให้ผลการรักษาดีรองจากการใช้ยาต้านมาลาเรียมาตรฐาน artesunate (รูปภาพที่ 25)

### อภิปรายผล

แม้ในปัจจุบันพืชกระท่อมจะถูกปลดจากสารเสพติดประเภทที่ 5 และมีการนำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ยังคงการศึกษาคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้งานนอกเหนือจากการนำไปใช้เพื่อความมึนเมา กระบี่กระเปาะ คลายเครียด หรือใช้เสพแทนสารเสพติดในหมู่วัยรุ่น โดยเฉพาะในทางการแพทย์ และหากมีการนำไปใช้โดยไม่มีการศึกษาข้อมูลก็อาจเกิดโทษมากกว่าประโยชน์ที่จะได้รับ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากใบกระท่อม ในหนูทดลองที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม โยอีไล พบว่า กระท่อมไม่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย แต่สามารถช่วยให้หนูที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม โยอีไล มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติในการต้านอักเสบของพืชกระท่อม และไม่เกิดพิษต่อตับหากใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้ ระหว่างปริมาณสารสกัดจากใบกระท่อม 75 และ 150 mg/kg พบว่าที่ให้ผลดีกว่า คือ 75 mg/kg โดยคำนวณจากหนูน้ำหนัก 30 g

### ข้อเสนอแนะ

หากงานวิจัยนี้มีประโยชน์ และเป็นที่น่าสนใจของผู้ที่ต้องการนำสารสกัดจากพืชกระท่อมไปใช้ศึกษาคุณสมบัติในการรักษาโรคมาลาเรีย เสนอแนะให้มีการใช้สารสกัดจากพืชกระท่อมผสมกับยามาตรฐานต้านมาลาเรียในการศึกษา และใช้ระยะเวลาในการศึกษาที่ยาวขึ้น

## รายการอ้างอิง

1. กระทรวงยุติธรรม. รวมกฎหมายยาเสพติดพร้อมด้วยกฎกระทรวง ระเบียบข้อบังคับที่ เกี่ยวข้อง. กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัดบางกอกบลิ๊อค; 2556.
2. อัยฉัตรกรชัย ส, อรุณา อสม, ลีเมธิตย์ ไ, แก้วประดับ น, ชิตตระกูล ส, หวังสินทวีกุล จ, et al. บทสรุปของพืชกระท่อม. พิมพ์ครั้งที่ 2 ed. สงขลา: ศูนย์ศึกษาปัญหาการเสพติด หน่วยระบาดวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์หาดใหญ่; 2562.
3. ขุนพล เ. การสื่อสารและการแสดงอัตลักษณ์เกี่ยวกับพฤติกรรมการดื่มน้ำกระท่อมบนสื่อสังคมออนไลน์. วารสารวิชาการนวัตกรรมสื่อสารสังคม [Internet]. 2020:[46-54 pp.].
4. แซ่มสุวรรณ อ. นิติวิทยาศาสตร์ 1 เพื่อการสืบสวนสอบสวน. พิมพ์ครั้งที่ 2 ed. กรุงเทพมหานคร: บริษัท พีซีจี พรินติ้ง จำกัด; 2545.
5. Orio L, Alexandru L, Cravotto G, Mantegna S, Barge A. UAE, MAE, SFE-CO<sub>2</sub> and classical methods for the extraction of *Mitragyna speciosa* leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2012;19(3):591-5.
6. E Adkins J, W Boyer E, R McCurdy C. *Mitragyna speciosa*, a psychoactive tree from Southeast Asia with opioid activity. *Current topics in medicinal chemistry*. 2011;11(9):1165-75.
7. Kumarnsit E, Keawpradub N, Nuankaew W. Acute and long-term effects of alkaloid extract of *Mitragyna speciosa* on food and water intake and body weight in rats. *Fitoterapia*. 2006;77(5):339-45.
8. Kumarnsit E, Vongvatcharanon U, Keawpradub N, Intasaro P. Fos-like immunoreactivity in rat dorsal raphe nuclei induced by alkaloid extract of *Mitragyna speciosa*. *Neuroscience letters*. 2007;416(2):128-32.
9. Vicknasingam B, Narayanan S, Beng GT, Mansor SM. The informal use of ketum (*Mitragyna speciosa*) for opioid withdrawal in the northern states of peninsular Malaysia and implications for drug substitution therapy. *International Journal of Drug Policy*. 2010;21(4):283-8.
10. Tungtanuwat W, Lawanprasert S. Fatal 4x100; home-made kratom juice cocktail. *Journal of Health Research*. 2010;24(1):43-7.
11. อารีชัยโชคชัย ค, สุดาทิพย์ ป, แซ่เจ็ง อ, และคณะ. แนวทางเวชปฏิบัติในการรักษาผู้ป่วยโรคไข้มาลาเรียประเทศไทย พ.ศ. 2562. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. นนทบุรี: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด; 2563.
12. De Souza JB, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to



our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection*. 2002;4(3):291-300.

13. สถาบันนิติเวชวิทยา. การผ่าศพทางนิติเวชศาสตร์ (Forensic Autopsy) กรุงเทพมหานคร: สถาบันนิติเวชวิทยา; 2019 [Available from: <http://www.ifm.go.th/th/ifm-book/ifm-textbook/112-lesson1.html>].
14. ปัญญาภู ุด, และคณะฯ. กระเทียม: สมุนไพรหรือยาเสพติด. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก [Internet]. 2559; 14(3):[242-56 pp.].
15. Gong F, Gu H-p, Xu Q-t, Kang W-y. Genus *Mitragyna*: Ethnomedicinal uses and pharmacological studies. *Phytopharmacology*. 2012;3(2):263-72.
16. Dargan PI, Wood DM. Novel psychoactive substances: classification, pharmacology and toxicology: Academic Press; 2021.
17. Takayama H, Ishikawa H, Kurihara M, Kitajima M, Aimi N, Ponglux D, et al. Studies on the synthesis and opioid agonistic activities of mitragynine-related indole alkaloids: discovery of opioid agonists structurally different from other opioid ligands. *Journal of medicinal chemistry*. 2002;45(9):1949-56.
18. Matsumoto K, Horie S, Ishikawa H, Takayama H, Aimi N, Ponglux D, et al. Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life sciences*. 2004;74(17):2143-55.
19. Matsumoto K, Horie S, Takayama H, Ishikawa H, Aimi N, Ponglux D, et al. Antinociception, tolerance and withdrawal symptoms induced by 7-hydroxymitragynine, an alkaloid from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life sciences*. 2005;78(1):2-7.
20. Matsumoto K, Takayama H, Narita M, Nakamura A, Suzuki M, Suzuki T, et al. MGM-9 [(E)-methyl 2-(3-ethyl-7a, 12a-(epoxyethoxy)-9-fluoro-1, 2, 3, 4, 6, 7, 12, 12b-octahydro-8-methoxyindolo [2, 3-a] quinolizin-2-yl)-3-methoxyacrylate], a derivative of the indole alkaloid mitragynine: A novel dual-acting  $\mu$ - and  $\kappa$ -opioid agonist with potent antinociceptive and weak rewarding effects in mice. *Neuropharmacology*. 2008;55(2):154-65.
21. Matsumoto K, Mizowaki M, Takayama H, Sakai S-I, Aimi N, Watanabe H. Suppressive effect of mitragynine on the 5-methoxy-N, N-dimethyltryptamine-induced head-twitch response in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1997;57(1-2):319-23.
22. Jansen KL, Prast CJ. Ethnopharmacology of kratom and the *Mitragyna* alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*. 1988;23(1):115-9.
23. Chittrakarn S, Sawangjaroen K, Prasettho S, Janchawee B, Keawpradub N. Inhibitory



effects of kratom leaf extract (*Mitragyna speciosa* Korth.) on the rat gastrointestinal tract. *Journal of ethnopharmacology*. 2008;116(1):173-8.

24. Yusoff NH, Suhaimi FW, Vadivelu RK, Hassan Z, Rümmler A, Rotter A, et al. Abuse potential and adverse cognitive effects of mitragynine (kratom). *Addiction biology*. 2016;21(1):98-110.
25. Reanmongkol W, Keawpradub N, Sawangjaroen K. Effects of the extracts from *Mitragyna speciosa* Korth. leaves on analgesic and behavioral activities in experimental animals. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2007;29(Suppl 1):39-48.
26. Harizal S, Mansor S, Hasnan J, Tharakan J, Abdullah J. Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in rodent. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;131(2):404-9.
27. Cheaha D, Keawpradub N, Sawangjaroen K, Phukpattaranont P, Kumarnsit E. Effects of an alkaloid-rich extract from *Mitragyna speciosa* leaves and fluoxetine on sleep profiles, EEG spectral frequency and ethanol withdrawal symptoms in rats. *Phytomedicine*. 2015;22(11):1000-8.
28. Parthasarathy S, Ramanathan S, Ismail S, Adenan MI, Mansor SM, Murugaiyah V. Determination of mitragynine in plasma with solid-phase extraction and rapid HPLC–UV analysis, and its application to a pharmacokinetic study in rat. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010;397(5):2023-30.
29. Janchawee B, Keawpradub N, Chittrakarn S, Prasettho S, Waratananurak P, Sawangjaroen K. A high-performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rats. *Biomedical Chromatography*. 2007;21(2):176-83.
30. Yusof SR, Mohd Uzid M, Teh EH, Hanapi NA, Mohideen M, Mohamad Arshad AS, et al. Rate and extent of mitragynine and 7-hydroxymitragynine blood–brain barrier transport and their intra-brain distribution: the missing link in pharmacodynamic studies. *Addiction biology*. 2019;24(5):935-45.
31. Buasri N, Sriwiriyanachan S, Sengnon N, Wungsintaweekul J, Udomuksorn W, Limsuwanchote S, et al. Pharmacokinetics of mitragynine in healthy Thai male volunteer. (Manuscript in preparation) [Internet].
32. เหมือนดาว ก. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนเพื่องานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และฤทธิ์ใน

การด้านแบคทีเรียจากกระท่อม. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2019.

33. สุวัฒน์ทัฬหะ ส, และคณะ. แนวทางการวินิจฉัยและดูแลรักษาโรคไข้มาลาเรีย ประเทศไทย พ.ศ. 2558. นนทบุรี: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.; 2558.
34. World WW. World Malaria Report Switzerland: Health Organization Press, Geneva; 2015 [
35. Sagaki P, Thanachartwet V, Desakorn V, Sahassananda D, Chamnanchanunt S, Chierakul W, et al. Clinical factors for severity of Plasmodium falciparum malaria in hospitalized adults in Thailand. PLoS One. 2013;8(8):e71503.
36. Hora R, Kapoor P, Thind KK, Mishra PC. Cerebral malaria—clinical manifestations and pathogenesis. Metabolic brain disease. 2016;31(2):225-37.
37. Promeneur D, Lunde LK, Amiry-Moghaddam M, Agre P. Protective role of brain water channel AQP4 in murine cerebral malaria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(3):1035-40.
38. จงวุฒิเวศย์ ส, ทิศชากร อ. มาลาเรีย. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. กรุงเทพมหานคร: บริษัท ธนาเพลส จำกัด.; 2559.
39. Miranda AS, Brant F, Rocha NP, Cisalpino D, Rodrigues DH, Souza DG, et al. Further evidence for an anti-inflammatory role of artesunate in experimental cerebral malaria. Malaria journal. 2013;12(1):1-13.
40. Reis PA, Comim CM, Hermani F, Silva B, Barichello T, Portella AC, et al. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. PLoS pathogens. 2010;6(6):e1000963.
41. Ghashghaeinia M, Bobbala D, Wieder T, Koka S, Brück J, Fehrenbacher B, et al. Targeting glutathione by dimethylfumarate protects against experimental malaria by enhancing erythrocyte cell membrane scrambling. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2010;299(4):C791-C804.
42. Valentin A, Benoit-Vical F, Péliissier Y, Koné-Bamba D, Mallié M. Antiplasmodial activity of plant extracts used in West African traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology. 2000;73(1-2):145-51.
43. Maranz S. An alternative paradigm for the role of antimalarial plants in Africa. The Scientific World Journal. 2012;2012.
44. Saidin N, Takayama H, Holmes E, Gooderham N. Cytotoxicity of Extract of Malaysian Kratom and its Dominant Alkaloid Mitragynine, on Human Cell Lines. Planta Medica.

2008;74(03):P-83.

45. Sabetghadam A, Navaratnam V, Mansor SM. Dose–response relationship, acute toxicity, and therapeutic index between the alkaloid extract of *Mitragyna speciosa* and its main active compound mitragynine in mice. *Drug Development Research*. 2013;74(1):23-30.
46. Singh D, Müller CP, Murugaiyah V, Hamid SBS, Vicknasingam BK, Avery B, et al. Evaluating the hematological and clinical-chemistry parameters of kratom (*Mitragyna speciosa*) users in Malaysia. *Journal of ethnopharmacology*. 2018;214:197-206.
47. Organization WH. Guidelines for the treatment of malaria: World Health Organization; 2015.
48. Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SH, Frevert U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS pathogens*. 2012;8(10):e1002982.
49. Crowley VM, Ayi K, Lu Z, Liby KT, Sporn M, Kain KC. Synthetic oleanane triterpenoids enhance blood brain barrier integrity and improve survival in experimental cerebral malaria. *Malaria journal*. 2017;16(1):1-11.
50. Azizi J, Ismail S, Mordi MN, Ramanathan S, Said MIM, Mansor SM. In vitro and in vivo effects of three different *Mitragyna speciosa* Korth leaf extracts on phase II drug metabolizing enzymes—glutathione transferases (GSTs). *Molecules*. 2010;15(1):432-41.
51. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011;50(5):600-13.
52. Storm J, Craig AG. Pathogenesis of cerebral malaria—inflammation and cytoadherence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014;4:100.
53. Ghazanfari N, Mueller SN, Heath WR. Cerebral malaria in mouse and man. *Frontiers in immunology*. 2018:2016.
54. Fu Y, Ding Y, Zhou T-L, Ou Q-y, Xu W-y. Comparative histopathology of mice infected with the 17XL and 17XNL strains of *Plasmodium yoelii*. *Journal of Parasitology*. 2012;98(2):310-5.
55. Christenson JC, Korgenski EK, Relich RF. Laboratory diagnosis of infection due to bacteria, fungi, parasites, and rickettsiae. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*: Elsevier; 2018. p. 1422-34. e3.
56. Basir R, Rahiman SF, Hasballah K, Chong W, Talib H, Yam M, et al. *Plasmodium berghei*

- ANKA infection in ICR mice as a model of cerebral malaria. *Iranian Journal of Parasitology*. 2012;7(4):62.
57. Aikawa M, Suzuki M, Gutierrez Y. Pathology of malaria. *Pathology, Vector Studies, and Culture*: Elsevier; 1980. p. 47-102.
58. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, et al. Malaria and the red cell. *ASH Education Program Book*. 2002;2002(1):35-57.
59. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *International journal of biological sciences*. 2011;7(9):1427.
60. PANDEY AV, TEKWANI BL, PANDEY VC. Characterization of hemozoin from liver and spleen of mice infected with *Plasmodium yoelii*, a rodent malaria parasite. *Biomedical Research*. 1995;16(2):115-20.
61. Deroost K, Lays N, Pham T-T, Baci D, Van den Eynde K, Komuta M, et al. Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the *Plasmodium* strain. *PloS one*. 2014;9(11):e113519.
62. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold spring harbor protocols*. 2008;2008(5):pdb. prot4986.
63. การวิจัยนาสิริกุล ธ. วิธีการทางห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา และจุลกายวิภาคศาสตร์. เชียงใหม่: หน่วยวารสารวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2538.
64. Utar Z, Majid MIA, Adenan MI, Jamil MFA, Lan TM. Mitragynine inhibits the COX-2 mRNA expression and prostaglandin E2 production induced by lipopolysaccharide in RAW264. 7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;136(1):75-82.
65. Gopalakrishnan AM, Kumar N. Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(1):317-25.
66. Alyousif MS, Saifi MA, Ahmed M, Alyousif SM. Histopathological changes induced by artesunate in liver of Wistar rat. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACOLOGY*. 2017;13(1):104-8.



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นุดกานต์ ทองสันทัด
วัน เดือน ปี เกิด	7 มกราคม 2532
สถานที่เกิด	สกลนคร
วุฒิการศึกษา	2550 - มัธยมปลาย โรงเรียนขอนแก่นวิทยายน วิทย-คณิต 2554 - ปริญญาตรี สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 2565 - ปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	391/83 โลบรารีเฮาส์คอนโด จรัญฯ 13 แขวงวัดท่าพระ เขตบางกอกใหญ่ กทม. 10600

