



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดใบกระท่อม

Chronic toxicity study of the crude extract of
Mitragyna speciosa Korth. leaves

วิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน

ปีงบประมาณ 2549-2551

กิติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2549-2551 และผ่านการพิจารณาเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้ว คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ จนทำให้โครงการวิจัยดำเนินไปด้วยดี ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2552

สารบัญเนื้อหา

เนื้อหา	หน้า
หน้าปก	1
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญเนื้อหา	4
สารบัญรูป	5
สารบัญตาราง	6
บทคัดย่อ	7
Abstract	8
บทนำ	9
วิธีการดำเนินการวิจัย	11
ผลการทดลอง	14
สรุปผลการทดลอง	16
เอกสารอ้างอิง	20

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูขาวเพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมที่ขนาด 400, 800 และ 1,600 mg/kg ค่าที่แสดงเป็น mean±S.E.M. ของร้อยละของน้ำหนักตัวของหนูขาวที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวของหนูขาวในวันแรกที่เริ่มการทดลอง (* = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)	22
2	กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูขาวเพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมที่ขนาด 400, 800 และ 1,600 mg/kg ค่าที่แสดงเป็น mean±S.E.M. ของร้อยละของน้ำหนักตัวของหนูขาวที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวของหนูขาวในวันแรกที่เริ่มการทดลอง (* = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)	23
3	แสดงภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ	24
4	แสดงภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบความผิดปกติ	28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนในหนู ขาวเพศเมียต่อค่าทางเคมีในเลือด (blood chemistry) (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)	30
2	ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนในหนู ขาวเพศผู้ต่อค่าทางเคมีในเลือด (blood chemistry) (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)	31
3	ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนในหนู ขาวเพศเมียต่อค่าทางโลหิตวิทยา (hematological parameters) (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)	32
4	ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนในหนู ขาวเพศผู้ต่อค่าทางโลหิตวิทยา (hematological parameters) (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)	32
5	ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนต่อ เนื้อเยื่อพยาธิวิทยา (histopathology) ของอวัยวะภายในของหนูขาวเพศเมีย	33
6	ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนต่อ เนื้อเยื่อพยาธิวิทยา (histopathology) ของอวัยวะภายในของหนูขาวเพศผู้	34

บทคัดย่อ

การทดลองในครั้งนี้จะทำการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดหยาบเมธานอลจากใบกระท่อม โดยให้หนูขาวได้รับสารสกัดทางปากวันละครั้งเป็นเวลา 6 เดือนติดต่อกัน หนูขาวสายพันธุ์ Wistar จะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะมีหนูขาวเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 20 ตัว หนูขาวแต่ละกลุ่มจะได้รับสารสกัดในขนาด 400, 800 และ 1,600 mg/kg สำหรับกลุ่มควบคุมจะได้รับน้ำกลั่นแทนสารละลายสารสกัดในปริมาตร 5 ml/kg สัตว์ทดลองทุกตัวจะถูกชั่งน้ำหนัก สังเกตอาการที่เกิดหลังจากได้รับสารสกัดทุกวัน เมื่อหนูขาวได้รับสารสกัดเป็นเวลา 6 เดือนจะทำการเก็บเลือดเพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าทางเคมี และ โลหิตวิทยา และเก็บเนื้อเยื่อสำคัญเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยา ผลการทดลองพบว่า ในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg มีการเพิ่มของน้ำหนักตัวน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดมีการเปลี่ยนแปลงค่าทางเคมีและโลหิตวิทยาอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่ glucose, triglyceride, cholesterol, HDL, uric acid, ALT, sodium, potassium, PMN, lymphocyte และ platelet count ส่วนในหนูเพศผู้ ได้แก่ triglyceride, cholesterol, HDL, uric acid, creatinine, ALT, sodium, potassium, WBC, PMN, lymphocyte และ platelet count แต่อย่างไรก็ตามระดับของค่าทางเคมีและโลหิตวิทยาที่เปลี่ยนแปลงเหล่านี้ยังอยู่ในพิสัยของค่าปกติของหนูขาวที่เคยมีรายงานมาก่อน ตรวจไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อและอวัยวะ ในขณะที่ทำ gross examination ในหนูขาวทุกตัว แต่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยาของหัวใจและปอดในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด และ ปอดและไตในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ในหนูขาวไม่ได้แปรผันตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบเมธานอลจากใบกระท่อมในขนาดที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ก่อให้เกิดอาการพิษที่ชัดเจนในหนูขาว

Abstract

This experiment was performed to study the chronic toxicity of crude methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Koth. leaves given orally to rat once daily for 6 months. Wistar rats were divided to 4 groups, 20 males and 20 females each. The rat in each group received the extract at the dose 400, 800 and 1,600 mg/kg. The control groups were given distilled water at the volume 5 ml/kg. All rats were weighed and observed any emerging symptoms after the extract administration. After the rats had received all treatments for 6 months, blood was collected from all rats for blood chemistry and hematological examinations. Internal organs and tissues were then collected for histopathological examination. The results has shown that the groups of rat which received the extract at the dose 800 an 1,600 mg/kg, both male and female, showed the significant decline in weight increase. In female rats which received the extract, the alterations in blood chemistry and hematology were significant as compared to the control. These changes were, in female rats, blood levels of glucose, triglyceride, cholesterol, HDL, uric acid, ALT, sodium, potassium, PMN, lymphocyte and platelet count. The changes in male rats were blood levels of triglyceride, cholesterol, HDL, uric acid, creatinine, ALT, sodium, potassium, WBC, PMN, lymphocyte and platelet count. Although these changes were significantly difference from the control, the values were within the normal range as previously reported. Gross examination in these rats showed no obvious alteration of the internal organs. In addition, histopathological studies showed small lesion in heart or lung of male rats, lung or kidney of female rats that received the extract. However, these alterations were not dose-dependent. These results suggested that the methanolic extract of *Mitragyna speciosa* at the doses used in this study did not cause any obvious detrimental effects in the rats.

บทนำ

กระท่อมเป็นพืชที่พบได้มากในพื้นที่หลายจังหวัดของภาคกลาง ภาคใต้ และตอนบนของประเทศไทยมาเลเซีย ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดปีพ.ศ. 2522 กระท่อมถูกจัดเป็นพืชเสพติดให้โทษประเภท 5 แต่อย่างไรก็ตามจากผลการสำรวจการประมาณการผู้ที่เกี่ยวข้องกับยาเสพติดในปี พ.ศ. 2544 พบว่าประมาณการจำนวนผู้ที่เคยกินใบกระท่อมทั้งประเทศมีสูงถึง 2,106,800 คน หรือคิดเฉลี่ยเป็นร้อยละ 4.7 ของประชากรทั้งประเทศ และมีอัตราการเคยกินใบกระท่อมสูงที่สุดอยู่ในภาคใต้ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 8.0 ของประชากรในภาคใต้ หรือประมาณ 452,500 คน (คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านข้อมูลและวิชาการด้านสารเสพติด, สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด, 2545) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าถึงแม้กระท่อมจะถูกประกาศให้เป็นพืชเสพติดแต่ประชาชนบางส่วนก็ยังนิยมใช้ใบกระท่อมกันอยู่โดยทั่วไป

สารสำคัญที่พบได้มากในใบกระท่อมคือ mitragynine ซึ่งเป็นสารพวกอินโดลแอลคาลอยด์ สารนี้สามารถให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้หลายประการและอาจก่อให้เกิดการเสพติดได้ นอกจาก mitragynine แล้วในใบกระท่อมยังมีสารประกอบพวกแอลคาลอยด์อีกหลายชนิด (Shellard, 1974) และอาจมีสารประกอบอื่นที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนซึ่งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่นอน ดังนั้นการเสพยากระท่อมซึ่งโดยปกติแล้วจะเสพยาโดยการเคี้ยวใบสดแล้วกลืนเอาแต่น้ำหรือกลืนทั้งกาก หรือนำผงแห้งของใบกระท่อมมาชงแบบชงชาแล้วดื่ม ส่วนแล้วแต่จะเป็นวิธีการที่ทำให้สารประกอบมากมายหลายชนิดเข้าสู่ร่างกายและอาจก่อให้เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์หรืออาการพิษขึ้นได้

ถึงแม้กระท่อมจะถูกจัดให้เป็นพืชเสพติดแต่กระท่อมก็ยังมีประโยชน์สำหรับการบำบัดอาการผิดปกติบางอย่างได้ เช่น เคยมีรายงานการใช้ใบกระท่อมในการแก้ท้องเสีย แก้ปวดแก้มือย หรือ รักษาอาการเบาหวาน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีกรณีของการใช้กระท่อมแบบผสมคือใช้ในกรณีทำให้ทำงานทน ทนแดด (บุญศิริ จันศิริมงคล, อ้างอิงถึงใน สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด, 2546) ปริมาณการเสพยากระท่อมมีตั้งแต่เสพวันละ 1 – 5 ใบ ไปจนถึงมากกว่า 50 ใบต่อวัน และส่วนใหญ่ของกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษามักเสพใบกระท่อมทุกวัน เคยมีรายงานถึงผลเสียของการใช้ใบกระท่อมโดยพบว่าการใช้ใบกระท่อมจะก่อให้เกิดการเสพติดและหากหยุดรับประทานใบกระท่อมจะเกิดอาการถอนยา (Suwanlert, 1975; Jansen and Prast, 1988) ดังนั้นผู้ที่เสพติดแล้วอาจต้องการใช้ใบกระท่อมอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานเพื่อป้องกันการเกิดอาการถอนยา ทั้งนี้ผลจากการใช้ใบกระท่อมอย่างต่อเนื่องไม่ว่าจะเป็นกรณีของการเสพติดหรือใช้แบบผสมก็ตาม อาจก่อให้เกิดอาการพิษและเป็นสาเหตุให้ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ประกอบกับยังมีการใช้ใบกระท่อมในการรักษาโรคหรือรักษาอาการโดยหมอพื้นบ้านกันอยู่ในปัจจุบัน จึงสมควรที่จะต้องมีการประเมินคุณค่าหรือโทษของกระท่อมที่มีต่อร่างกาย ประกอบกับยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการประเมินความ

เป็นพิษของพืชกระท่อมมาก่อน ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทดสอบพิษอย่างเรื้อรังของสารสกัดจากใบกระท่อมในสัตว์ทดลอง

สิ่งที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น พืชกระท่อมถึงแม้จะถูกจัดให้เป็นพืชเสพติดแต่ก็ยังคงมีการลักลอบใช้กันอยู่ในหมู่ประชากรทั่วประเทศเป็นจำนวนมาก และมีอัตราการใช้สูงที่สุดในกลุ่มประชากรของภาคใต้ การเสพใบกระท่อมเป็นจำนวนมากต่อวันหรือการเสพติดต่อกันเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติของร่างกายได้ จากการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลนานาชาติ เช่น NAPRALERT และ MEDLINE พบว่าการศึกษเกี่ยวกับพืชกระท่อมมีไม่มากนัก โดยเฉพาะรายงานที่กล่าวถึงโทษของพืชกระท่อมที่ได้รับการอ้างอิงถึงโดยทั่วไปมีเพียงรายงานเดียว (Suwanlert, 1975) ซึ่งเน้นในเรื่องของการรายงานการสำรวจข้อมูลและอาการของผู้ที่เสพติดกระท่อม 30 คน บุญศิริ จันศิริมงคล ได้รายงานการศึกษาภาวะสุขภาพของประชากรที่เสพพืชกระท่อม อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 386 ราย พบว่าในผู้ที่เสพกระท่อมส่วนใหญ่จะมีการกระฉับกระเฉง-ขยัน(79.3%) อารมณ์แจ่มใส ร่าเริง (70.5%) หายปวดเมื่อย(69.2%) คลายกังวล-คลายเครียด(50.5%) สำหรับอาการที่เกิดขึ้นซึ่งอาจเป็นอาการข้างเคียง ได้แก่ ผิวดำ(23.1%) ท้องผูกหรือปวดท้อง(16.1%) นอนไม่หลับ(7.5%) ผอมลง(7.5%) คอแห้ง/ตาพร่า(4.9%) ใจเต้นแรง(3.6%) คลื่นไส้อาเจียน(3.1%) ชีด(2.8%) ผิวแห้ง(2.6%) สั่นหรือกระตุก(2.1%) ชัก(0.3%) หมดสติ(0.3%) (สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด, 2546) อย่างไรก็ตามในรายงานไม่ได้ระบุความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการใช้หรือระยะเวลาการใช้ใบกระท่อมกับกลุ่มอาการที่เกิดขึ้น และในกลุ่มประชากรที่กำลังศึกษานั้นอาจใช้หรือไม่ใช้สารออกฤทธิ์หรือวัตถุออกฤทธิ์อื่น เช่น กาแฟ เครื่องดื่มชูกำลัง บุหรี่ หรือยาเสพติดอื่น ๆ ฯลฯ ทำให้ไม่อาจจำแนกได้ว่าอาการข้างเคียงใดเกิดขึ้นจากการใช้พืชกระท่อม

ในตำรายาไทยใช้ใบกระท่อมเพื่อแก้อาการปวดท้อง แก้กิด แก่ท้องเสีย หรือใช้เสพทดแทนฝิ่น (วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุลและคณะ, 2538; Suwanlert, 1975) ในปัจจุบันยังมีการใช้ใบกระท่อมในการแก้ท้องเสีย และ รักษาโรคเบาหวาน อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการวิจัยที่ยืนยันความปลอดภัยของการใช้ใบกระท่อมหรือรายงานพิษภัยของการใช้ใบกระท่อม โดยเฉพาะการใช้กระท่อมเป็นระยะเวลานาน ติดต่อกันไม่ว่าจะเป็นการใช้ใบกระท่อมอย่างต่อเนื่องในกรณีของการเสพติด หรือการใช้ยาฝิ่นแทน เพื่อให้ทำงานได้ทน ทนแดด ไม่เหนื่อย หรือใช้ในการรักษาโรคที่ต้องใช้ระยะเวลานานในการรักษานาน เช่น โรคเบาหวาน เป็นต้น ดังนั้นการวิจัยเพื่อทดสอบพิษเรื้อรังของใบกระท่อมจึงมีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่งต่อการสร้างองค์ความรู้พื้นฐานที่จะนำมาสู่การประเมินความปลอดภัยของการใช้ใบกระท่อมในตำรายาไทยหรือหมอพื้นบ้าน และยังสามารถเชื่อมโยงองค์ความรู้นี้ไปสู่การวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพเพื่อประเมินคุณค่าหรือโทษของใบกระท่อมในคนต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองเป็นหนูขาวสายพันธุ์ Wistar แหล่งที่มาคือ หน่วยเรียนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้สัตว์ทดลองเพศผู้และ เพศเมีย จำนวนอย่างละ 80 ตัว อายุ 10 สัปดาห์ น้ำหนักตัวเมียประมาณ 200-240 กรัม น้ำหนักตัวผู้ประมาณ 250-300 กรัม สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในห้องปรับอากาศแวดล้อมให้มีอุณหภูมิ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $55 \pm 5\%$ มีแสงสว่าง 12 ชั่วโมงและมีมืด 12 ชั่วโมง ได้รับอาหารมาตรฐานและน้ำดื่ม(น้ำกรองผ่านเครื่อง reverse osmosis)เท่าที่ ต้องการ เลี้ยงด้วยกรงมาตรฐานขนาดกว้างxยาวxสูง เป็น $10.5 \times 19 \times 8$ นิ้ว จำนวน 4 ตัวต่อกรง ใช้วัสดุรองพื้นกรงเป็น wood chip ผลิตจากไม้สนและได้รับการตรวจวิเคราะห์สารพิษ โลหะหนัก และสารอันตรายอื่น ๆ และได้รับการรับรองว่าสามารถใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองได้อย่างปลอดภัย วัสดุทุกชนิดที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลองจะผ่านการฆ่าเชื้อโรคโดยการนึ่งความร้อนด้วยเครื่อง autoclave ตามวิธีมาตรฐานของการนึ่งฆ่าเชื้อ สัตว์ทดลองจะถูกนำมาพักไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลอง การใช้สัตว์ทดลองในการทดลองนี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์แล้ว

การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบกระท่อม

ใบกระท่อมที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดหยาบเมธานอลที่ใช้การทดลองนี้ ได้มาจากแหล่งธรรมชาติภายในจังหวัดสงขลาและจังหวัดสตูล การตรวจพิสูจน์ใบกระท่อมดำเนินการโดยภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และตัวอย่างใบกระท่อมที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ถูกเก็บรักษาไว้ตามตัวอย่างหมายเลข PCOG/MS001-002

นำใบกระท่อมสด (251 กิโลกรัม) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นและอบแห้งในตู้อบชนิดเป่าลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 เซลเซียส จากนั้นนำใบกระท่อมแห้งนำมาบดเป็นผงละเอียด แล้วแช่ในเมธานอลเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรองเอาชิ้นของเหลวมาระเหยด้วยเครื่องระเหย rotary evaporator ภายใต้อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียสเพื่อกำจัดตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดหยาบเมธานอล (crude methanol extract) ส่วนกากนำมาสกัดซ้ำด้วยเมธานอลอีก 2 ครั้ง รวมสารสกัดหยาบที่ได้ทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน แล้วนำมาระเหยให้เข้มข้นภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator และระเหยจนแห้งด้วยวิธี freeze dry ผงแห้งของสารสกัดหยาบเมธานอลจากใบกระท่อม(4.69 กิโลกรัม)จะถูกเก็บรักษาไว้ในขวดสีชาปิดสนิทป้องกันแสงสว่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมสารสกัดดังกล่าวข้างต้นทำที่ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ และภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง

1. สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะมีจำนวนหนูขาวเพศผู้ 20 ตัว และเพศเมีย 20 ตัว ในแต่ละกลุ่มจะได้รับสารละลายสารสกัดใบกระท่อมในขนาด 400, 800 และ 1600 mg/kg วันละครั้ง โดยการกรอกทางปากเป็นเวลา 6 เดือน(180 วัน) สำหรับกลุ่มควบคุมจะได้รับแต่เฉพาะน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นตัวแทนของสารสกัด ปริมาตรของสารละลายสารสกัดหรือน้ำกลั่นที่ให้แก่สัตว์ทดลองจะมีปริมาตรคงที่ที่ 5 ml/kg สำหรับสารสกัดกระท่อมที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเขวนตะกอนในน้ำกลั่นโดยเตรียมให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และมีปริมาณเพียงพอสำหรับการใช้ในแต่ละวัน

2. ทำการชั่งน้ำหนักของสัตว์ทดลองทุกตัวทุกวันจนเสร็จสิ้นการทดลอง

3. ทำการตรวจสอบและบันทึกอาการหรืออาการแสดงของความผิดปกติในสัตว์ทดลองทุกตัวหรือจำนวนสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตทุกวัน

4. หากพบสัตว์ทดลองที่ตายให้ทำ gross necrosy จากนั้นจะผ่าตัดแยกอวัยวะและเนื้อเยื่อสำคัญตามข้อ 7 และเก็บรักษาไว้ใน 4% formaldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline pH 7.4

5. เมื่อทำการทดลองครบ 6 เดือนให้งดอาหารและน้ำแก่สัตว์ทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมงแล้วทำการสลับสัตว์ทดลอง จากนั้นจะทำการเก็บเลือดจากแอ่งใต้ตาของสัตว์ทดลองทุกตัว แยกเลือดที่เก็บได้ของสัตว์ทดลองแต่ละตัว เลือดที่เก็บได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะบรรจุลงในหลอดเก็บเลือดที่มี EDTA ในอัตราส่วน 2 mg/ml เพื่อนำไปทำการตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยาด้วยเครื่อง Celldyn 3500[®] (Abbott Laboratories) ค่าที่ทำการตรวจวัดได้แก่

- total red and white blood cell count
- differential white cell count
- hemoglobin
- hematocrit
- platelet count

เลือดอีกส่วนที่เหลือนำมาแยกซีรัมเพื่อทำการวัดค่าทางเคมีด้วยเครื่อง COBAS MIRA[®] (Roche) ดังต่อไปนี้

- total protein
- albumin
- alkaline phosphatase
- AST
- ALT
- glucose
- blood urea nitrogen (BUN)

- creatinine
- total bilirubin
- direct bilirubin

การเก็บเลือดเพื่อวัดระดับน้ำตาลในเลือด

เก็บเลือด 1 ml บรรจุลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุ EDTA : sodium fluoride ในอัตราส่วน 2 : 1 (mg/ml of blood) นำไปปั่นที่ 2000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บ supernatant 0.4 ml เพื่อวัดระดับน้ำตาลโดยใช้เครื่อง clinical chemical analyzer (COBAS MIRA, Roche)

6. หลังจากทำการเก็บเลือดแล้ว สัตว์ทดลองทั้งหมดจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบเพื่อทำ gross necropsy (รวมทั้งทำ gross necropsy ในสัตว์ทดลองทุกตัวที่ตายในระหว่างการทดลอง) หากตรวจพบ lesions, เนื้องอก หรือ lesions ที่สงสัยว่าจะเป็นเนื้องอกให้ผ่าตัดแยกและเก็บรักษาไว้ใน 8% formaldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline pH 7.4 เพื่อทำการตรวจสอบในภายหลัง จากนั้นจะผ่าตัดแยกอวัยวะและเนื้อเยื่อสำคัญ ได้แก่

- ตับ
- ไต
- หัวใจ
- ปอด
- ม้าม
- กล้ามเนื้อ
- หลอดอาหาร
- กระเพาะอาหาร
- ลำไส้ (duodenum, jejunum และ ileum)
- ตับอ่อน
- รังไข่ หรือ อัณฑะ
- มดลูก และท่อรังไข่
- ผิวหนัง
- ต่อมหมวกไต
- ต่อมพินอคิวรี และ
- สมอง

นำเนื้อเยื่อที่ตัดแยกได้มาจุ่มแช่ในสารละลาย 0.9% sodium chloride ในน้ำกลั่นเป็นจำนวน 2 ครั้งเพื่อล้างเลือดและเศษเนื้อเยื่อที่ติดมากับอวัยวะหรือเนื้อเยื่อดังกล่าว ต่อจากนั้นจึงนำอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่ต้องการไปเก็บรักษาไว้ใน 8% formaldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline pH 7.4

การตรวจสอบทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยา (histopathology)

ทำการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยาในทุกอวัยวะและเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 6 ที่เก็บได้จากสัตว์ทดลองทุกตัวที่ใช้ในการทดลองนี้ เนื้อเยื่อดังกล่าวที่ถูกเก็บรักษาใน 8% formaldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline pH 7.4 จะถูกนำไปผ่านขั้นตอนการตัดชิ้นเนื้อเยื่อและย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin เพื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean \pm standard error of mean (S.E.M.)) ของค่าที่ได้จากสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม และทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 14.0 ข้อมูลที่ได้จะของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มจะถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติ One-way analysis of variance (one-way ANOVA) โดยในเบื้องต้นจะทำการทดสอบ homogeneity of variances โดย Levene test ในกรณีที่ผลการทดสอบพบว่ากลุ่มข้อมูลไม่มีความแปรปรวนของ variances จะทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยดังกล่าวด้วยวิธี Dunnett test ในกรณีที่ผลการทดสอบพบว่ากลุ่มข้อมูลมีความแปรปรวนของ variances จะทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยดังกล่าวด้วยวิธี Tamhane test กลุ่มข้อมูลจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า $p < 0.05$

ผลการทดลอง

1. ผลของสารสกัดหยาบเมธานอลจากใบกระท่อมต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง

ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 1 และ รูปที่ 2 สัตว์ทดลองทุกตัวที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลองเพิ่มขึ้นจากวันแรกที่เริ่มทำการทดลอง โดยในสัตว์ทดลองเพศเมียจะมีการเพิ่มของน้ำหนักตัวน้อยกว่าในสัตว์ทดลองเพศผู้ ในสัปดาห์แรกที่เริ่มการทดลองสัตว์ทดลองเพศเมียทุกกลุ่มจะมีน้ำหนักตัวลดลงจากเมื่อเริ่มทำการทดลอง ($-2.7 \pm 0.77\%$, $-2.0 \pm 0.67\%$, $-2.0 \pm 0.72\%$ และ $-3.09 \pm 0.63\%$ สำหรับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารละลายสารสกัดในขนาด 400, 800 และ 1600 mg/kg ตามลำดับ) หลังจากนั้นน้ำหนักตัวจะเพิ่มขึ้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในกลุ่มสัตว์ทดลองเพศผู้ สัตว์ทดลองบางตัวจะมีน้ำหนักตัวลดลงในสัปดาห์แรกที่เริ่มทำการทดลอง แต่ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองที่เพิ่มขึ้นในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากนั้นน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะเพิ่มขึ้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มจะพบว่า ในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับสารละลายสารสกัดกระท่อมในขนาด 800

และ 1600 mg/kg จะมีการเพิ่มของน้ำหนักตัวน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทั้งในสัตว์ทดลองเพศผู้และเพศเมีย

2. ผลต่อค่าทางเคมีของเลือด (blood chemistry)

ผลการทดลองในหนูขาวเพศเมียแสดงดังตารางที่ 1 และหนูขาวเพศผู้แสดงดังตารางที่ 2 การให้สารสกัดหยาบเมธานอลแก่หนูขาวเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าจะทำให้ระดับ glucose ในเลือดของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 1,600 mg/kg ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) อย่างไรก็ตามผลนี้ไม่พบในหนูขาวเพศผู้ ระดับ cholesterol ในเลือดของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 400, 800 และ 1,600 mg/kg เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และ ระดับ cholesterol ในเลือดของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 400 และ 1,600 mg/kg เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ)เช่นกัน ในทำนองเดียวกันในหนูขาวเพศเมียและหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 400 และ 1,600 mg/kg จะมีระดับของ HDL cholesterol เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ส่วนระดับ triglyceride ในหนูขาวเพศเมียและหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg จะมีระดับลดลงอย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$)

ระดับ uric acid ในเลือดของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลนี้พบได้ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 1,600 mg/kg ($p < 0.05$)

ในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg จะมีระดับเอนไซม์ ALT สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ในขณะที่สารสกัดในขนาด 1,600 mg/kg จะทำให้เอนไซม์ ALT ในหนูขาวเพศผู้มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน

การให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนทำให้ระดับของ electrolytes พวก sodium และ potassium ในเลือดทั้งหนูขาวเพศผู้และเพศเมียลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในหนูเพศเมีย สารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg ทำให้ระดับ sodium และ potassium ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในหนูขาวเพศผู้สารสกัดในขนาด 400, 800 และ 1,600 mg/kg ทำให้ระดับ potassium ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ในขณะที่สารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg ทำให้ระดับ sodium ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

นอกจากผลของสารสกัดที่มีต่อค่าทางเคมีของเลือดตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ค่าทางเคมีอื่น ๆ ได้แก่ creatinine, BUN, total protein, albumin, direct bilirubin, total bilirubin, alkaline phosphatase และ chloride ต่างก็ไม่มีเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญหลังจากหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียได้รับสารสกัดทั้ง 3 ขนาดเป็นเวลา 6 เดือน

3. ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

ผลการทดลองแสงดังตารางที่ 3 และ 4 ในหนูเพศเมียผลของสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมในขนาด 400 และ 800 mg/kg ทำให้ระดับของ PMN ลดลงและ lymphocyte เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) ส่วนสารสกัดในขนาด 800 mg/kg มีผลทำให้ระดับของ platelet ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในหนูเพศผู้ผลของสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมในขนาด 1,600 mg/kg ทำให้ระดับของ WBC และ lymphocyte เพิ่มขึ้นและ PMN ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) นอกจากนี้สารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg ทำให้ระดับของ platelet ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ)

4. ผลต่อเนื้อเยื่อพยาธิวิทยา(histopathology)ของอวัยวะภายในของหนูขาว

ผลของสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมที่มีต่ออวัยวะภายในสำคัญของหนูขาวทั้งเพศเมียและเพศผู้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ การให้สารสกัดแก่หนูขาวเป็นเวลา 6 เดือนไม่พบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในอวัยวะภายในของหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมีย อย่างไรก็ตามจากการตรวจทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยาพบว่าหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 1,600 mg/kg มีรอยโรคเป็น granuloma ที่ปอดจำนวน 1 ตัว และที่ได้รับสารสกัดในขนาด 800 mg/kg มีรอยโรคเป็น ureteritis ที่ไตจำนวน 1 ตัว ส่วนในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 400 และ 800 mg/kg มีหนูขาวที่มีรอยโรคของ focal infarct ที่หัวใจขนาดละ 1 ตัว และในหนูขาวที่ได้รับสารสกัดในขนาด 400 mg/kg มีหนูขาวที่มีรอยโรคของ myocarditis ที่หัวใจจำนวน 1 ตัว และมีหนูขาวอีกจำนวน 1 ตัวที่มีรอยโรคของ granuloma ที่ปอดซึ่งเป็นหนูขาวที่ได้รับสารสกัดในขนาด 800 mg/kg

สรุปผลการทดลอง

จากข้อมูลภาคสนามพบว่ามีผู้ป่วยที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลซึ่งมีอาการที่เกิดขึ้นหลังจากการใช้ใบกระท่อมและผู้ป่วยคาดว่าอาจจะเป็นผลที่เกิดขึ้นจากการใช้ใบกระท่อมเป็นระยะเวลานาน ประกอบกับมีผู้ป่วยโรคเรื้อรัง เช่น โรคเบาหวาน เคยใช้ใบกระท่อมในการรักษาโรคและเนื่องจากโรคนี้เป็นโรคเรื้อรังที่ต้องการการรักษาเป็นระยะเวลานาน ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยที่ใช้ใบกระท่อมในการรักษาโรคนี้อาจได้รับอาการข้างเคียงและอาการพิษจากการใช้ใบกระท่อมเป็นระยะเวลานานได้ การทดลองในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาถึงความเป็นพิษที่อาจเกิดจากการใช้ใบกระท่อมเป็นระยะเวลานานติดต่อกัน โดยทำการทดลองโดยการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมแก่หนูขาวทางปากเป็นระยะเวลานาน 6 เดือนติดต่อกัน ขนาดของสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น 400, 800 และ 1,600 mg/kg ซึ่งขนาด 400 และ 800 mg/kg จะเป็นขนาดที่พบว่าทำให้เกิดผลในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกชักนำให้เป็นโรคเบาหวาน (สุภาภรณ์ ประเสริฐ ไร่ และคณะ, 2550)

จากรายงานการวิจัยของสุภาภรณ์ ประเสริฐ และคณะ (2550) พบว่าสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมในขนาด 400 และ 800 mg/kg มีผลในการลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูขาวที่ถูกชักนำให้เป็นโรคเบาหวานแต่ไม่มีผลในการลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูขาวปกติ ผลการทดลองดังกล่าวนั้นสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมในขนาด 400 และ 800 mg/kg ไม่มีผลในการลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ซึ่งไม่ได้ถูกชักนำให้เป็นโรคเบาหวาน อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมในขนาดที่สูงขึ้นเป็น 1,600 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูขาวเพศเมียได้แต่ไม่มีผลในหนูขาวเพศผู้

สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมมีผลต่อระดับไขมันในเลือดอย่างชัดเจน สารสกัดในขนาด 400, 800 และ 1,600 mg/kg ในหนูขาวเพศเมีย และขนาด 400 และ 1,600 mg/kg ในหนูขาวเพศผู้ จะทำให้ระดับของ cholesterol ในเลือดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับสารสกัดในขนาด 800 mg/kg ที่ให้แก่หนูขาวเพศผู้ถึงแม้ว่าจะไม่ทำให้ระดับ cholesterol ในเลือดเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญแต่ก็มีแนวโน้มที่จะทำให้ระดับ cholesterol ในเลือดเพิ่มขึ้น ในขณะที่สารสกัดในขนาด 400 และ 1,600 mg/kg สามารถเพิ่มระดับ HDL cholesterol ในหนูขาวเพศเมียและหนูขาวเพศผู้ได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าในคนการมีระดับ cholesterol ในเลือดสูงกว่าเกณฑ์ปกติจะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคของหลอดเลือดแดงจากภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงบางบริเวณของเยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelium) โดยมีจำนวนเซลล์บุผิว (endothelium cells) เพิ่มขึ้นพร้อมกับการสะสมของ cholesterol ในบริเวณนั้น จนทำให้หลอดเลือดบริเวณนั้นแคบลง และเสียความยืดหยุ่นไปในที่สุด (Kusumi et al, 1988) อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของ HDL จะทำให้ความเสี่ยงต่าง ๆ ดังกล่าวลดลง ผลจากการทดลองในครั้งนี้ที่สารสกัดจากใบกระท่อมมีผลทำให้ระดับ cholesterol ในเลือดของหนูขาวเพิ่มขึ้นอาจทำให้ความเสี่ยงของการเกิดโรคของหลอดเลือดแดงดังกล่าวข้างต้น แต่ความเสี่ยงนี้อาจลดลงได้เนื่องจากผลของสารสกัดที่เพิ่มระดับของ HDL ในเลือด

ผลจากการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ตรวจพบ focal infarct ในหัวใจของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 400 และ 800 mg/kg ขนาดละ 1 ตัว ทั้งนี้ในคนการเกิดโรค atherosclerosis ซึ่งจะทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงจาก atherosclerotic plaques ซึ่งจะนำไปสู่ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดและกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) ใน plaque นี้จะมีส่วนประกอบที่เป็น fibrin, platelets, endothelial cells, inflammatory cells และ smooth muscle cells กลไกที่ก่อให้เกิด atherosclerotic plaques นั้นอาจเกี่ยวข้องกับ thrombosis, smooth muscle proliferation และ extracellular matrix deposition (Thrall et al, 2004) ทั้งนี้การมีระดับ cholesterol ในเลือดในระดับสูงเชื่อว่าจะเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิด atherosclerosis อย่างไรก็ตามการเกิด atherosclerosis อาจต้องอาศัยปัจจัยอื่นร่วมด้วยนอกเหนือไปจากการมีระดับ cholesterol ในเลือดสูง ดังนั้นผลของสารสกัดที่ทำให้ระดับ

cholesterol ในเลือดเพิ่มขึ้นอาจไม่ใช่สาเหตุที่นำไปสู่การเกิด atherosclerosis ประกอบกับสารสกัดทำให้ระดับ HDL เพิ่มขึ้นซึ่งจะลดความเสี่ยงของการเกิดโรคดังกล่าวลงได้ ดังนั้น การเกิด myocardial infarct ในการทดลองในครั้งนี้อาจเกี่ยวข้องหรือไม่เกี่ยวข้อง กับผลของสารสกัดที่ทำให้มีระดับ cholesterol ในเลือดสูง ซึ่งจะต้องมีการศึกษากันต่อไป

ในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg จะมีการเพิ่มของน้ำหนักตัวน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน เป็นที่น่าสนใจว่าระดับ triglyceride ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหล่านี้มีระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนด้วยเช่นกัน สำหรับกลไกที่ทำให้หนูขาวมีการเพิ่มของน้ำหนักตัวน้อยลงนั้นอาจมีความเป็นไปได้ที่จะเกี่ยวข้องกับระดับ triglyceride ในเลือด การได้รับ triglyceride จากอาหาร หรือ การใช้ triglyceride ภายในร่างกายของหนูขาวซึ่งจะต้องทำการศึกษากันต่อไป

ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg ทำให้ระดับของเอนไซม์ ALT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และสารสกัดในขนาด 1,600 mg/kg ทำให้ระดับของเอนไซม์ ALT ในหนูขาวเพศผู้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นกัน การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ ALT ในเลือดจะเป็นตัวชี้บ่งถึงความผิดปกติของตับ (Thrall et al, 2004) ดังนั้นการให้สารสกัดในขนาดสูง (800 และ 1,600 mg/kg) แก่หนูขาวอาจก่อให้เกิดความผิดปกติของตับขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามผลจากการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาไม่พบความผิดปกติของตับทั้งในหนูขาวเพศผู้และเพศเมีย จึงมีความเป็นไปได้ว่าความผิดปกติที่อาจมีขึ้นที่ตับอาจเกิดขึ้นในระดับต่ำถึงแม้จะมีการให้สารสกัดแก่หนูขาวเป็นเวลานานถึง 6 เดือนก็ตาม

โซเดียม (Sodium) เป็น cation ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในเลือด อีออนนี้มีหน้าที่สำคัญในการรักษา osmotic pressure, สมดุลย์กรด-ด่างของเลือด และการแพร่สัญญาณประสาท โพแทสเซียม (potassium) ก็เป็น cation ที่สำคัญต่อการทำงานของเซลล์และพบได้ในเลือด โพแทสเซียมทำงานประสานกันกับโซเดียมในการรักษาระดับสมดุลย์ออสโมติก สมดุลย์กรด-ด่าง และเป็น cation ที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ประสาทและการทำงานของกล้ามเนื้อ (Thrall et al, 2004) จากผลการทดลองที่พบว่าสารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg ที่ทำให้ระดับของโซเดียมและโพแทสเซียมในเลือดทั้งในหนูขาวเพศเมียและเพศผู้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) อย่างไรก็ตามการลดลงของทั้งโซเดียมและโพแทสเซียมนี้เกิดขึ้นไม่มากนักและไม่พบความผิดปกติในสัตว์ทดลองที่อาจเกิดจากการลดลงของอีออนทั้งสอง

สารสกัดในขนาด 400 และ 800 mg/kg ทำให้ระดับของ neutrophils, lymphocytes และ platelet count ในเลือดของหนูขาวเพศเมียเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่สารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg ทำให้ระดับของ WBC, neutrophils, lymphocytes และ platelet count ในเลือดของหนูขาวเพศผู้เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงระดับดังกล่าวนี้ยังอยู่ในพิสัยที่เป็นค่าปกติของหนูขาว (Sharp et al, 1998, Thrall et al, 2004)

ผลจากการตรวจทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยาพบว่า มีสัตว์ทดลองบางตัวที่ได้รับสารสกัดและมีรอยโรคเกิดที่หัวใจ ปอด และไต อย่างไรก็ตามรอยโรคเหล่านี้ไม่ได้มีเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับ จึงมีความเป็นไปได้ว่าการเกิดรอยโรคเหล่านี้อาจไม่ได้เกี่ยวข้องกับการได้รับสารสกัดหรืออาจมีปัจจัยอื่นที่เป็นสาเหตุของการก่อรอยโรค ประกอบกับไม่พบความผิดปกติที่เนื้อเยื่ออื่นในหนูที่ได้รับสารสกัด ดังนั้นผลจากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมไม่ได้ก่อให้เกิดความเป็นพิษที่ชัดเจนต่ออวัยวะภายในของสัตว์ทดลองที่ทำการศึกษา

ผลจากการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมโดยให้หนูขาวได้รับสารสกัดติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือนในครั้งนี้พบว่าสารสกัดในขนาด 800 และ 1,600 mg/kg ทำให้หนูขาวมีการเพิ่มของน้ำหนักตัวน้อยลง ไม่พบอาการหรือการเปลี่ยนแปลงค่าทางเคมี โลหิตวิทยา และเนื้อเยื่อพยาธิวิทยาที่ชัดเจนที่จะชี้บ่งถึงความเป็นพิษของสารสกัด ดังนั้นผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบเมธานอลจากใบกระท่อมในขนาดที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ก่อให้เกิดอาการพิษที่ชัดเจนในหนูขาว

เอกสารอ้างอิง

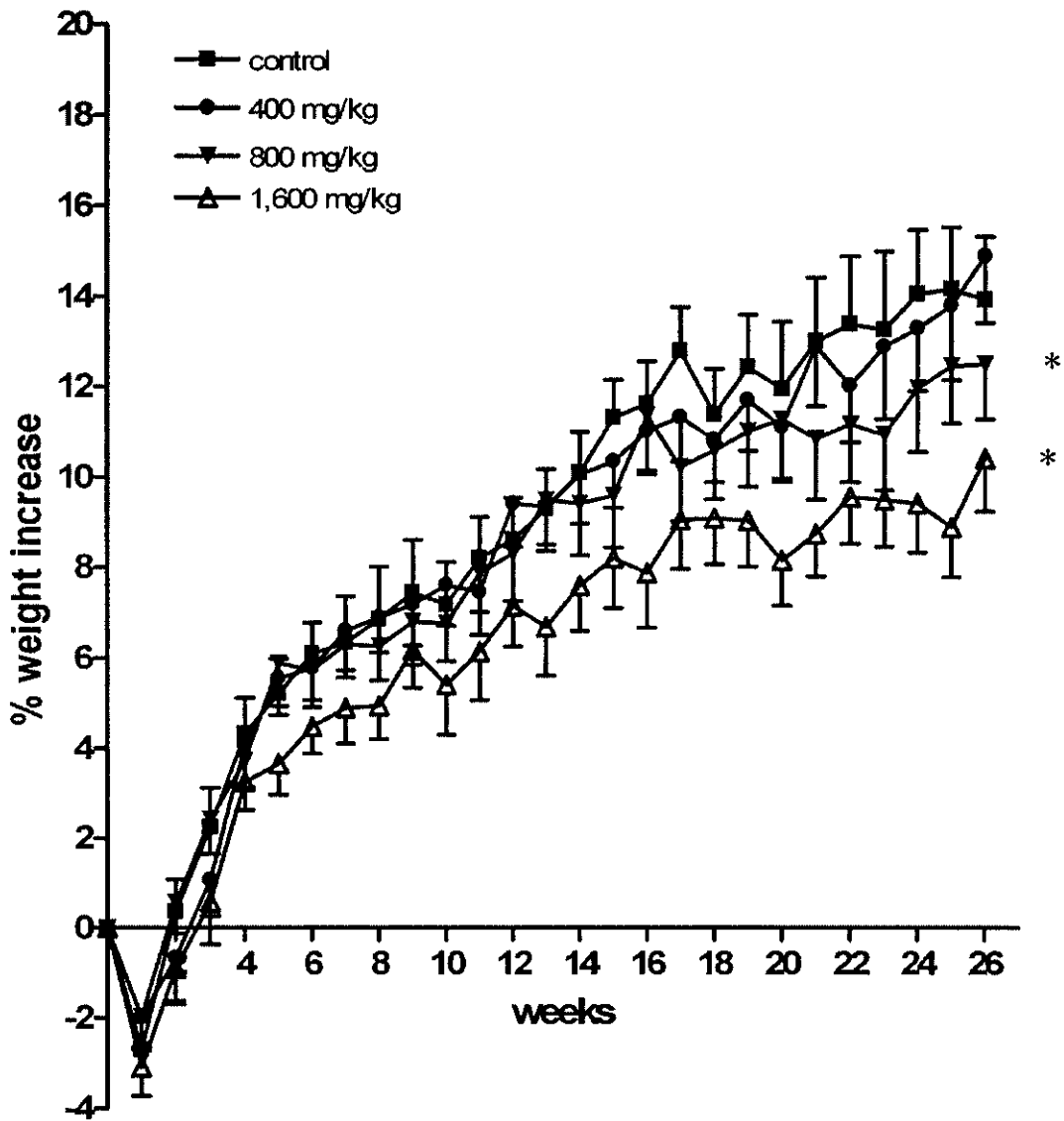
- Jansen KLR and Prast CJ. (1988) Ethnopharmacology of Kratom and the mitragyna alkaloids. *J Ethnopharmacol.* 23: 115-119.
- Kusumi, Y., Scanu, A.M., McGill, H.C. and Wissler, R.W. (1993) Atherosclerosis in a rhesus monkey with genetic hypercholesterolemia and elevated plasma Lp(a). *Atherosclerosis* 99(2):165-74.
- Sharp, P.E., La Regina, M.C. and Suckow, M.A. (1998) *The Laboratory Rat*. CRC Press, Boca Raton, p.16
- Shellard EJ. (1974) The alkaloids of *Mitragyna* with special reference to those of *Mitragyna speciosa*, Korth. *Bull Narc.* 26(2):41-55.
- Suwanlert S. (1975) A study of kratom eaters in Thailand. *Bull Narc.* 27:21-27.
- Thrall, M.A., Baker, D. C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Debar, A. and Weiser, G. (2004) *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams and Wilkins, New York.
- คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านข้อมูลและวิชาการด้านสารเสพติด, สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด (2545) สถานภาพการใช้ยาและสารเสพติด พ.ศ. 2544, รายงานผลโครงการประมาณการจำนวนผู้เกี่ยวข้องกับยาเสพติดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ.
- วงศ์สถิตย์ น่วมสกุล, รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์ และ วิจิต เปานิล (2538) สยามไภษัชยพิถกษณ์ ภูมิปัญญาของชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน). กรุงเทพฯ
- สุภาภรณ์ ประเศรษโฐ, จันทิภา บุรินทรภิบาล, สมสมร ชิตตระการ, นิวัติ แก้วประดับ, กิจจา สว่างเจริญ และ เบญจมาศ จันทร์ฉวี (2550) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของสารสกัดหยาบใบกระท่อม (Hypoglycemic Effect of the Crude Extract of *Mitragyna speciosa* Korth. Leaves), ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด (2546) รายงานการประชุมวิชาการ เรื่อง พืชกระท่อม: สมุนไพรหรือพืชเสพติด. กรุงเทพฯ.

Websites

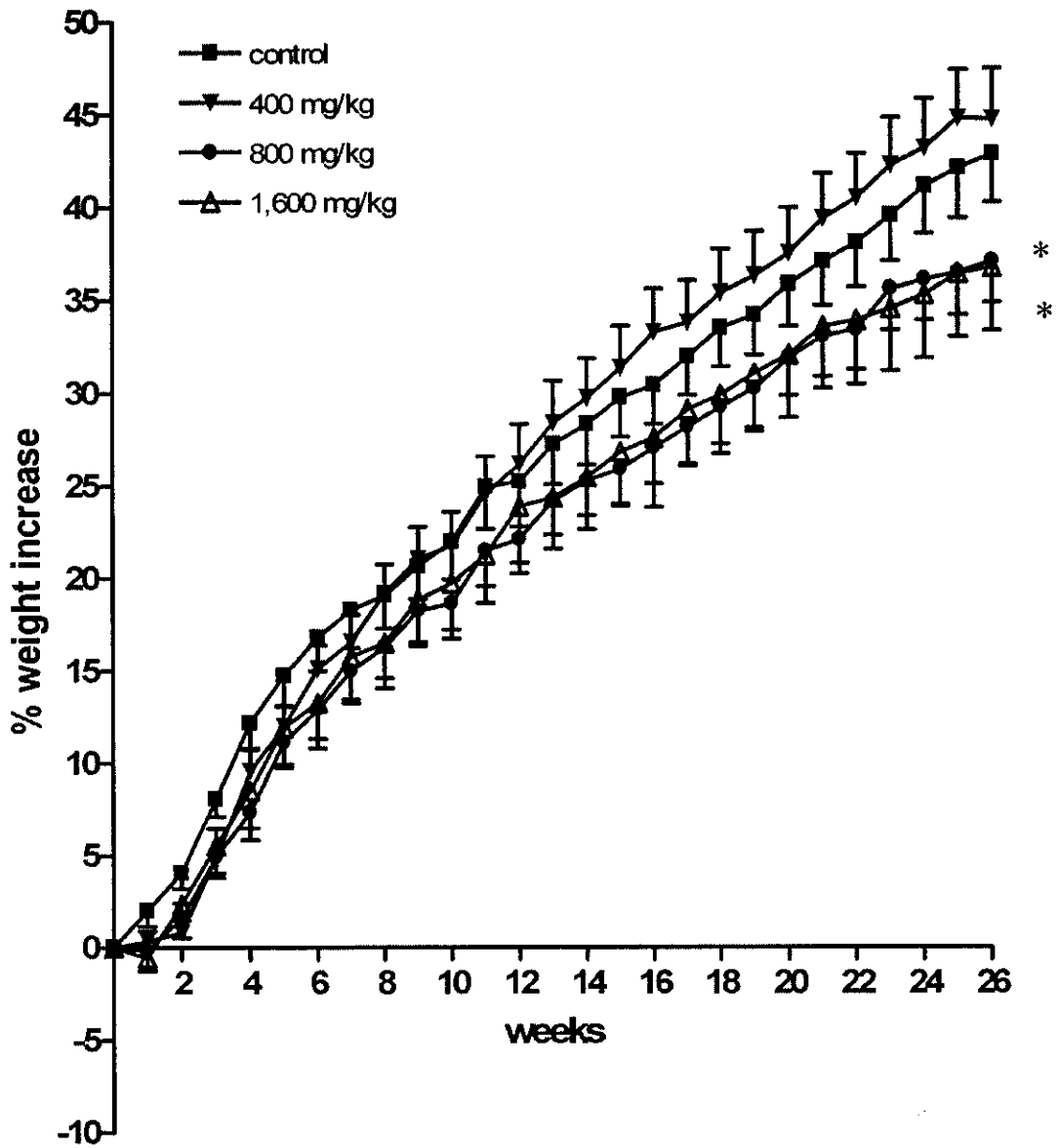
Reference Values for Laboratory Animals, Research Animal Resources, University of Minnesota
(<http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>)

University of Arizona, University Animal Care, Pathology services, Reference Values, Hematology
(http://www.uac.arizona.edu/invest/business/hematology_reference_values.pdf)

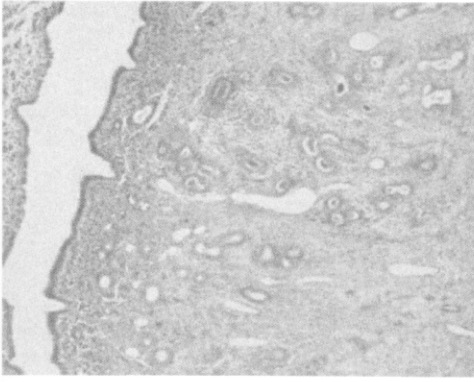
University of Arizona, University Animal Care, Pathology services, Reference Values, Clinical
Chemistry
(<http://www.uac.arizona.edu/invest/business/chemistry.pdf>)



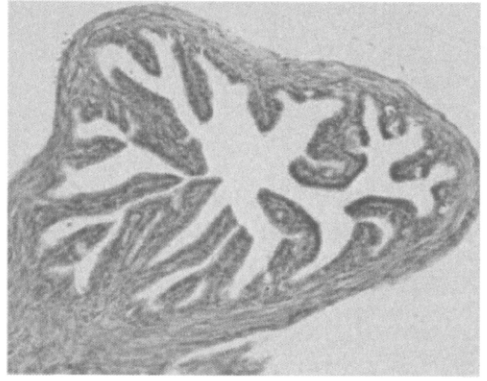
รูปที่ 1 กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูขาวเพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเมรานอลของใบกระท่อมที่ขนาด 400, 800 และ 1,600 mg/kg ค่าที่แสดงเป็น mean±S.E.M. ของร้อยละของน้ำหนักตัวของหนูขาวที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวของหนูขาวในวันแรกที่เริ่มการทดลอง (* = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)



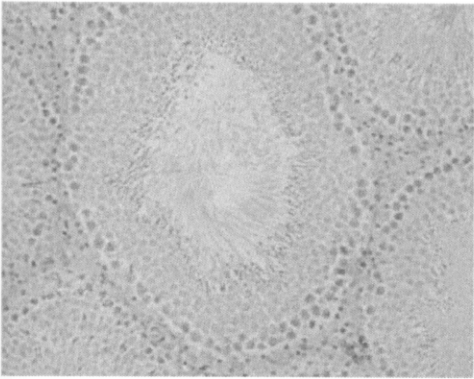
รูปที่ 2 กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูขาวเพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมที่ขนาด 400, 800 และ 1,600 mg/kg ค่าที่แสดงเป็น mean±S.E.M. ของร้อยละของน้ำหนักตัวของหนูขาวที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวของหนูขาวในวันแรกที่เริ่มการทดลอง (* = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)



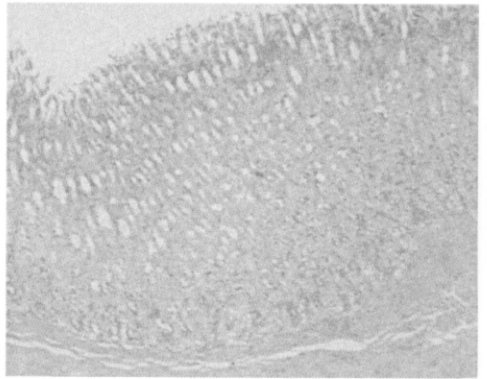
Uterus



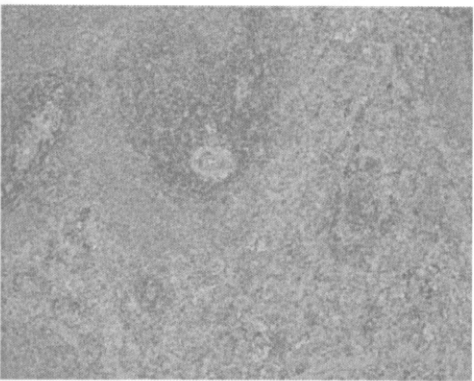
Fallopian tube



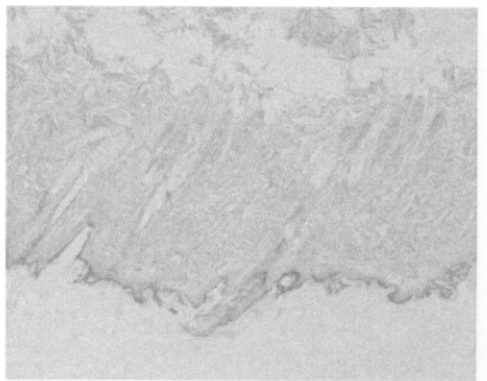
Testis



Stomach

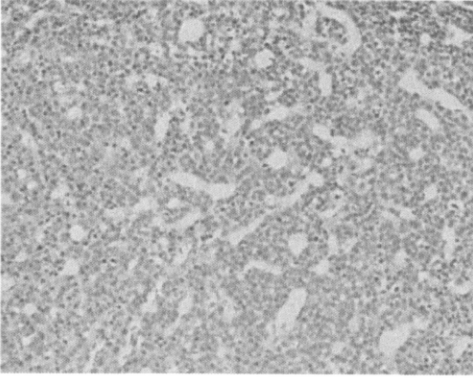


Spleen

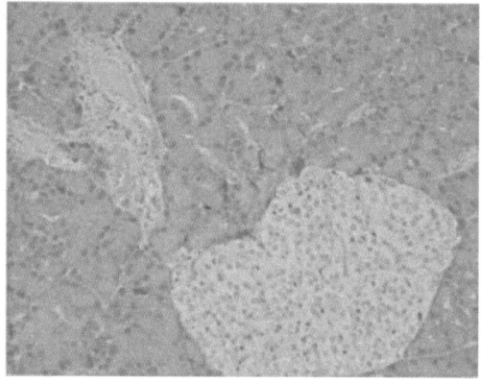


Skin

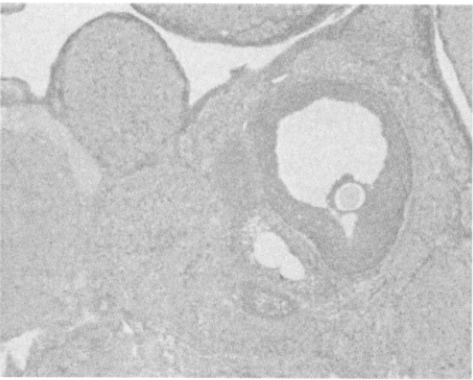
รูปที่ 3 แสดงภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ



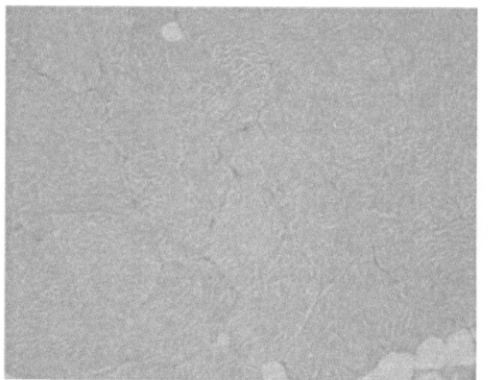
Pituitary gland



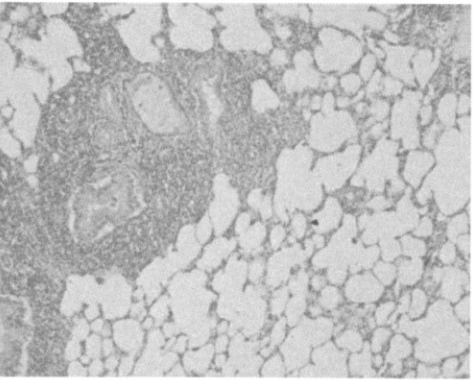
Pancreas



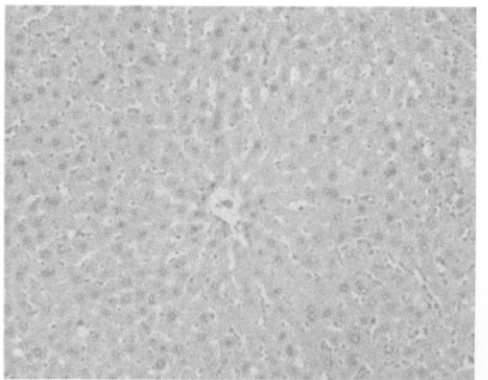
Ovary



Muscle

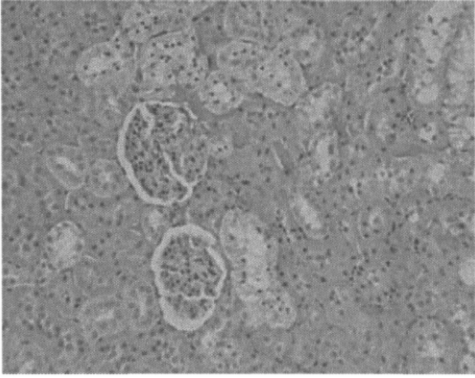


Lung

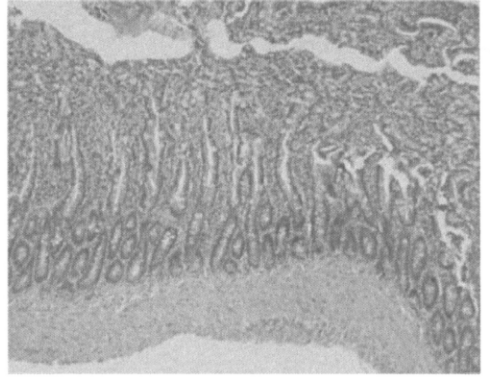


Liver

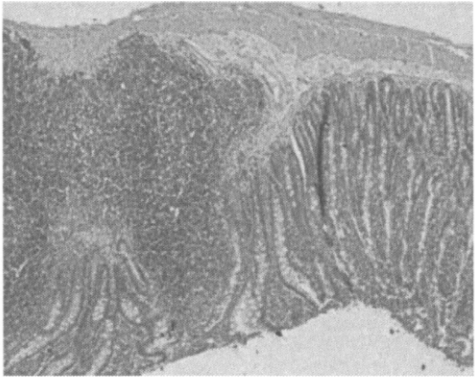
รูปที่ 3 แสดงภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ (ต่อ)



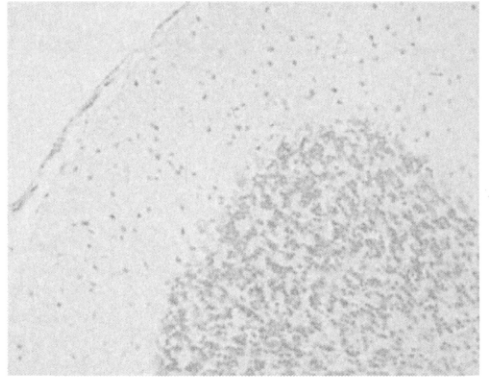
Kidney



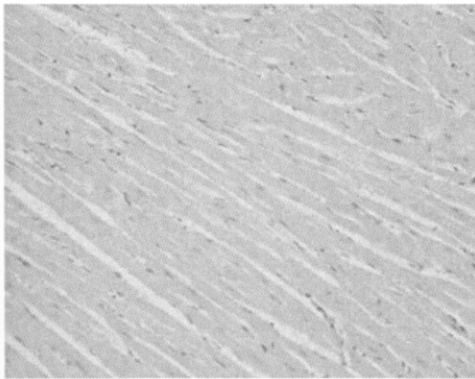
Jejunum



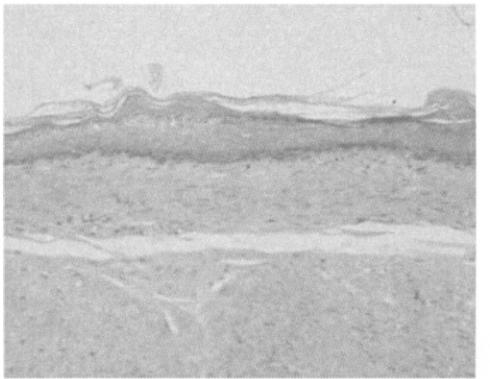
Ileum



Cerebellum

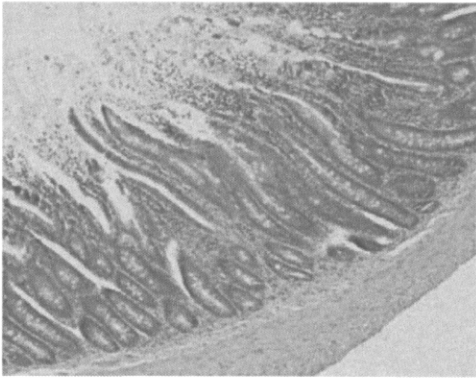


Heart

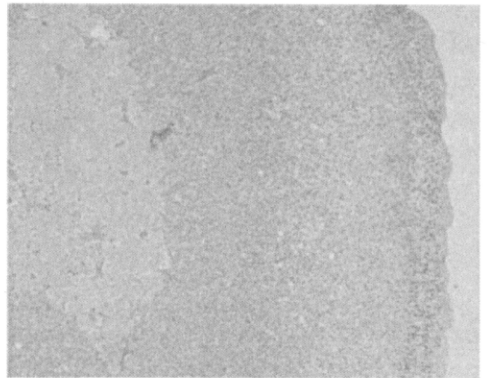


Esophagus

รูปที่ 3 แสดงภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ (ต่อ)

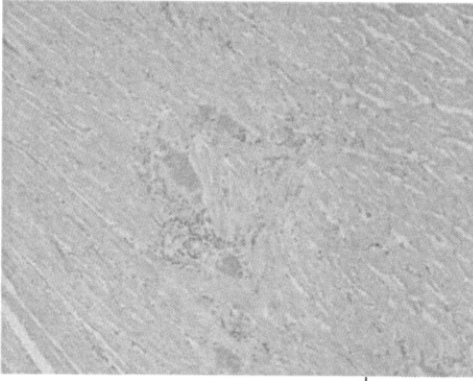


Duodenum

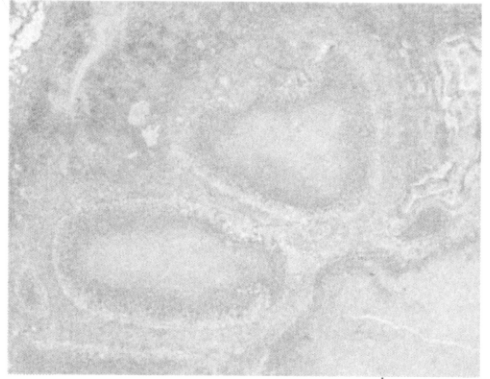


Adrenal gland

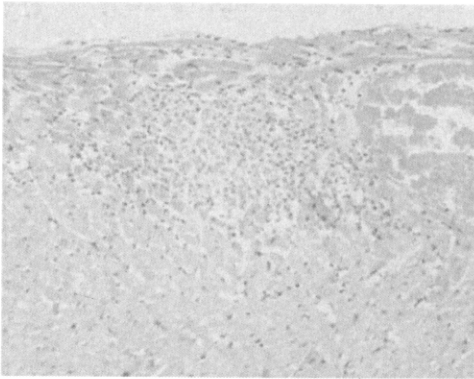
รูปที่ 3 แสดงภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติ (ต่อ)



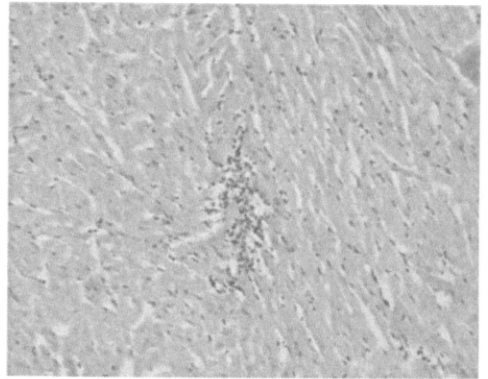
Focal infarct (Heart) ตัวอย่างที่ 1



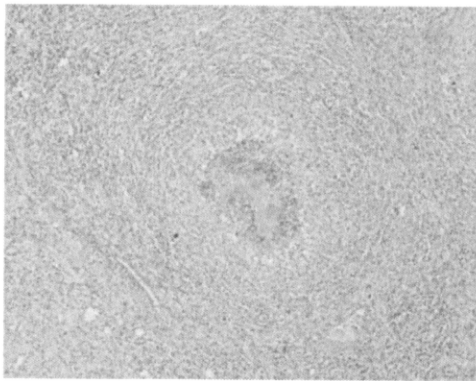
Granuloma (Lung) ตัวอย่างที่ 2



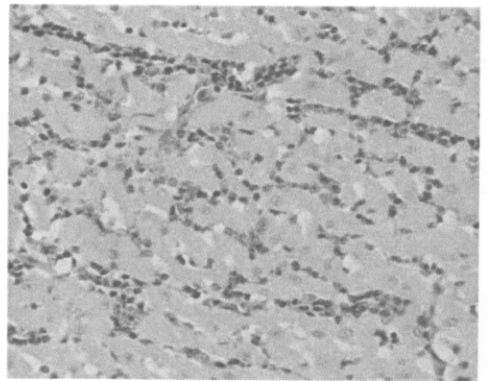
Focal infarct (Heart) ตัวอย่างที่ 2



Myocarditis ตัวอย่างที่ 1

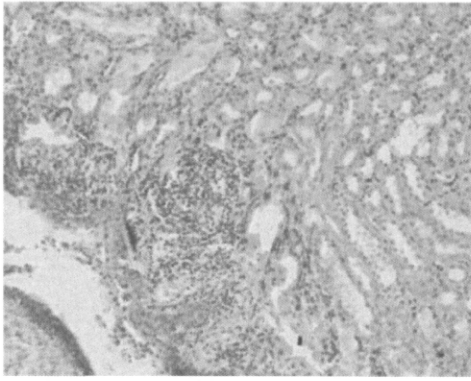


Granuloma (Lung) ตัวอย่างที่ 1



Myocarditis

รูปที่ 4 แสดงภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบความผิดปกติ



Ureteritis

รูปที่ 4 แสดงภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบความผิดปกติ (ต่อ)

Parameters	Treatment (mean±S.E.)			
	Control	400 mg/kg	800 mg/kg	1600 mg/kg
Glucose (mg%)	104.9 ± 3.50	98.6 ± 4.00	101.4 ± 4.16	89.2 ± 3.34 **
Cholesterol (mg%)	69.9 ± 3.17	89.0 ± 2.99 **	86.9 ± 3.52 **	94.9 ± 3.45 **
Triglyceride (mg%)	97.8 ± 6.28	87.7 ± 4.99	54.4 ± 4.43 **	51.2 ± 3.16 **
HDL-Cholesterol (mg%)	53.2 ± 2.59	68.4 ± 2.30 **	57.1 ± 3.61	64.7 ± 2.71 **
Uric-acid (mg%)	1.9 ± 0.15	1.6 ± 0.15	1.5 ± 0.11	1.4 ± 0.08 *
BUN (mg%)	24.4 ± 0.92	24.0 ± 1.02	25.2 ± 1.21	24.9 ± 0.74
Creatinine (mg%)	1.1 ± 0.02	0.9 ± 0.03	1.0 ± 0.03	0.9 ± 0.02
Total protein (g%)	8.2 ± 0.09	8.5 ± 0.10	8.4 ± 0.11	8.6 ± 0.13
Albumin (g%)	2.8 ± 0.04	3.0 ± 0.08	2.9 ± 0.07	2.9 ± 0.05
Direct Bilirubin (g%)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Total Bilirubin (g%)	0.18 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01
SGOT[AST] (U/L)	204.4 ± 15.24	214.6 ± 12.11	192.2 ± 14.97	164.8 ± 8.56
SGPT[ALT] (U/L)	46.7 ± 3.06	52.7 ± 3.79	64.4 ± 3.45 **	66.8 ± 4.00 **
Alkaline phosphatase (U/L)	52.7 ± 3.23	49.1 ± 3.04	51.2 ± 3.32	51.2 ± 3.68
Sodium (mmole/L)	150.5 ± 0.85	152.9 ± 0.75	141.8 ± 1.34 **	143.9 ± 1.34 **
Potassium (mmole/L)	5.3 ± 0.28	4.8 ± 0.19	4.1 ± 0.14 **	4.0 ± 0.10 **
Chloride (mmole/L)	108.2 ± 2.14	105.5 ± 1.00	101.7 ± 1.10	102.2 ± 0.41

ตารางที่ 1 ผลของการให้สารสกัดหยาบเมรานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนในหนูขาวเพศเมียต่อค่าทางเคมีในเลือด (blood chemistry) (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

Parameters	Treatment (mean±S.E.)			
	Control	400 mg/kg	800 mg/kg	1600 mg/kg
Glucose (mg%)	111.2 ± 2.89	107.8 ± 5.20	99.8 ± 4.16	113.1 ± 5.21
Cholesterol (mg%)	75.2 ± 2.64	86.7 ± 2.84 *	82.3 ± 2.77	94.5 ± 3.42 **
Triglyceride (mg%)	80.9 ± 6.22	78.6 ± 5.29	41.7 ± 2.12 **	40.7 ± 3.75 **
HDL-Cholesterol (mg%)	51.4 ± 1.80	60.8 ± 2.25 *	55.4 ± 2.63	64.2 ± 2.71 **
Uric-acid (mg%)	0.6 ± 0.08	0.7 ± 0.07	0.8 ± 0.05 *	0.8 ± 0.05 *
BUN (mg%)	22.7 ± 0.92	21.6 ± 0.83	23.1 ± 1.35	20.5 ± 1.25
Creatinine (mg%)	0.9 ± 0.02	0.9 ± 0.02	0.9 ± 0.02	0.8 ± 0.02 **
Total protein (g%)	7.9 ± 0.07	8.1 ± 0.09	8.1 ± 0.10	8.1 ± 0.09
Albumin (g%)	2.6 ± 0.08	2.6 ± 0.04	2.6 ± 0.05	2.4 ± 0.05
Direct Bilirubin (g%)	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Total Bilirubin (g%)	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01
SGOT[AST] (U/L)	207.4 ± 14.04	199.6 ± 13.39	186.0 ± 11.02	177.3 ± 11.75
SGPT[ALT] (U/L)	70.2 ± 2.57	73.4 ± 2.87	69.4 ± 3.43	83.9 ± 5.99 *
Alkaline phosphatase (U/L)	101.7 ± 10.57	85.7 ± 3.88	90.4 ± 3.75	90.3 ± 4.92
Sodium (mmole/L)	151.6 ± 0.74	153.9 ± 0.51	143.1 ± 1.17 **	146.2 ± 0.73 **
Potassium (mmole/L)	6.3 ± 0.36	4.5 ± 0.09 **	4.4 ± 0.17 **	4.4 ± 0.16 **
Chloride (mmole/L)	106.5 ± 0.61	107.3 ± 0.83	101.8 ± 0.37	104.9 ± 0.54

ตารางที่ 2 ผลของการให้สารสกัดหยาดเมฆชานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนในหนูขาวเพศผู้ต่อค่าทางเคมีในเลือด (blood chemistry) (* = p<0.05, ** = p<0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

Parameters	Treatment (Mean±S.E.)			
	Control	400 mg/kg	800 mg/kg	1600 mg/kg
WBC (K/μl)	5.4 ± 0.58	5.0 ± 0.24	5.6 ± 0.29	6.6 ± 0.32
PMN(neutrophil) (%)	44.3 ± 2.97	29.2 ± 0.77 **	23.3 ± 1.03 **	38.9 ± 2.21
Lymphocyte (%)	50.8 ± 2.60	70.3 ± 0.82 **	75.5 ± 1.09 **	60.2 ± 2.08 **
RBC (M/ μl)	8.4 ± 0.10	8.5 ± 0.22	8.3 ± 0.09	8.4 ± 0.08
Hb (g/dl)	15.7 ± 0.19	16.1 ± 0.18	16.2 ± 0.12	15.7 ± 0.35
Hct (%)	45.6 ± 0.32	47.4 ± 0.61	48.0 ± 0.46	45.5 ± 1.22
MCV (fL)	55.8 ± 0.43	56.4 ± 0.47	56.5 ± 0.42	55.3 ± 0.47
Platelets count (K/μl)	923.6 ± 29.68	817.5 ± 34.63	754.2 ± 31.48	835.7 ± 79.39

ตารางที่ 3 ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนในหนูขาวเพศเมียต่อค่าทางโลหิตวิทยา (hematological parameters) (* = p<0.05, ** = p<0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

Parameters	Treatment (Mean±S.E.)			
	Control	400 mg/kg	800 mg/kg	1600 mg/kg
WBC (K/μl)	7.0 ± 0.28	7.3 ± 0.36	7.0 ± 0.34	9.0 ± 0.56 **
PMN(neutrophil) (%)	38.1 ± 1.78	37.3 ± 1.73	36.5 ± 1.69	28.7 ± 1.67 **
Lymphocyte (%)	59.3 ± 2.16	61.3 ± 1.71	62.5 ± 1.37	68.7 ± 1.80 **
RBC (M/ μl)	9.1 ± 0.11	9.1 ± 0.08	9.3 ± 0.20	9.3 ± 0.32
Hb (g/dl)	16.1 ± 0.13	16.7 ± 0.18	16.8 ± 0.16	16.8 ± 0.20
Hct (%)	46.5 ± 0.30	48.3 ± 1.79	47.4 ± 1.17	50.3 ± 0.59
MCV (fL)	52.1 ± 0.22	52.9 ± 0.35	52.5 ± 0.31	53.1 ± 0.42
Platelets count (K/μl)	912.0 ± 26.0	788.2 ± 47.49 *	768.2 ± 34.02 **	714.7 ± 39.30 **

ตารางที่ 4 ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนในหนูขาวเพศผู้ต่อค่าทางโลหิตวิทยา (hematological parameters) (* = p<0.05, ** = p<0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

ตารางที่ 5 ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนต่อเนื้อเยื่อพยาธิวิทยา (histopathology) ของอวัยวะภายในของหนูขาวเพศเมีย

Organ	Microscopic finding	Dose of crude methanolic extract of <i>Mitragyna speciosa</i>			
		Control	400 mg/kg	800 mg/kg	1600 mg/kg
Heart	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Liver	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Lung	Granuloma	0/19	0/19	0/19	1/20
Spleen	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Kidney	Ureteritis	0/19	0/19	1/19	0/20
Esophagus	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Stomach	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Duodenum	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Jejunum	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Ileum	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Pancreas	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Adrenal gland	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Pituitary gland	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Skin	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Brain	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Uterus	-	0/19	0/19	0/19	0/20
Ovary	-	0/19	0/19	0/19	0/20

ตารางที่ 6 ผลของการให้สารสกัดหยาบเมธานอลของใบกระท่อมเป็นเวลา 6 เดือนต่อเนื้อเยื่อพยาธิวิทยา (histopathology) ของอวัยวะภายในของหนูขาวเพศผู้

Organ	Microscopic finding	Dose of crude methanolic extract of <i>Mitragyna speciosa</i>			
		Control	400 mg/kg	800 mg/kg	1600 mg/kg
Heart	Focal infarct	0/20	1/20	1/20	0/20
	Myocarditis	0/20	1/20	0/20	0/20
Liver	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Lung	Granuloma	0/20	0/20	1/20	0/20
Spleen	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Kidney	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Esophagus	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Stomach	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Duodenum	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Jejunum	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Ileum	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Pancreas	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Adrenal gland	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Pituitary gland	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Skin	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Brain	-	0/20	0/20	0/20	0/20
Testes	-	0/20	0/20	0/20	0/20