บทที่ 4

วิจารณ์

4.1 การเปรียบเทียบวิธีตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ด้วยวิธีสเมียร์โดยตรงกับวิธีเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

ห้องปฏิบัติการส่วนมากตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ด้วยวิธีสเมียร์โดยตรงเพียงอย่างเดียว ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อใช้วิธีสเมียร์โดยตรงสามารถตรวจพบ *B. hominis* เพียง 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.21 แต่เมื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าสามารถตรวจพบ *B. hominis* เพิ่มขึ้นเป็น 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.52 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zaman และ Khan (1994) จากการตรวจตัวอย่างอุจจาระ 100 ตัวอย่าง ด้วยวิธีสเมียร์โดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงพบว่า ตรวจพบ *B. hominis* ร้อยละ 18 และ 45 ตามลำดับ Leelayoova *et al*. (2002) ศึกษา *B. hominis* ในทหารไทยก็พบว่า การวินิจฉัยโดยวิธีเพาะเลี้ยงจะได้ผลดีกว่าวิธีอื่นๆ การศึกษาของ Pillay *et al*. (1994) ในการวินิจฉัย *T. vaginalis* ก็ได้ผลในทำนองเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้ แต่ผลจากการศึกษาของ Kukoschke *et al*. (1990) ได้ทำการตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ด้วยวิธีทั้งสองแล้วพบว่าการตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองตรวจพบเชื้อไม่แตกต่างกับวิธีสเมียร์โดยตรง ซึ่งแตกต่างไปจากการศึกษาของผู้อื่น โดยผู้วิจัยได้สรุปว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญมากเกินไปจนทำให้เชื้อโปรโตซัวไม่สามารถเจริญได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้รวมทั้งผลการศึกษาอื่นๆ ส่วนมากพบว่าการตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองตรวจพบเชื้อได้มากกว่าวิธีตรวจสเมียร์โดยตรง จึงควรแนะนำให้ห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้วิธีเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ในกรณีที่สงสัยหรือใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยา

4.2 การศึกษาการเติบโต (growth curve) ของโปรโตซัวในลำไส้ในหลอดทดลอง

Zierdt และ Swan (1981) ศึกษาการเติบโตของ *B. hominis* ในหลอดทดลอง พบว่าในเวลา 24 ชั่วโมงแรกเชื้อเพิ่มขึ้น ร้อยละ 2 ของเชื้อเริ่มต้น ภายใน 3-5 วัน เป็นระยะเวลาที่เชื้อเพิ่มสูงสุดซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่เชื้อเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง การทดลองครั้งนี้พบว่า generation time ของ *B. hominis* (Bh_1) เท่ากับ 6.2 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Lanuza *et al*., 1997 ที่ศึกษาการเติบโตของ *B. hominis* พบว่ามี generation time อยู่ในช่วง 6.6-12.1 ชั่วโมง เมื่อ Zierdt และ Swan (1981) ทำการศึกษา generation time ของ *B. hominis* หลายๆ สายพันธุ์ พบว่า แต่ละสายพันธุ์มี generation time ที่ต่างกัน เช่น สายพันธุ์ Netsky, Struble, Monkey, Dalmeida, Corn, Nand, Baiza และ Held มี generation time เท่ากับ 8.5, 8.6, 9.2, 10.8 11.6, 15.9 และ 19.4 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของ generation time ทั้ง 8 สายพันธุ์ เท่ากับ 11.7 ชั่วโมง นอกจากนี้สภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ชนิดของอาหาร อุณหภูมิที่บ่ม ความเป็นกรด-ด่าง จำนวนเชื้อเริ่มต้น (Lanuza *et al*., 1997; Kukoschke *et al*., 1990) มีผลต่อการเจริญของเชื้อได้

4.3 การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรที่ใช้ในการทดลองต่อโปรโตซัวในลำไส้ในหลอดทดลอง

ได้มีสมุนไพรหลายชนิดที่มีการกล่าวถึงฤทธิ์ในการรักษาอาการเป็นบิด หรือท้องร่วง ท้องเสียตำรับยาโบราณตามส่วนต่างๆ ของโลก ในเมืองไทยก็มีการกล่าวถึงการใช้สมุนไพร เช่น ทับทิม มังคุด มารักษาโรคบิดตั้งแต่สมัยพระนั่งเกล้าเจ้าอยู่หัว (Thammapalerd, 1993) แต่การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรต่อโปรโตซัวในลำไส้ที่ถูกต้องทางวิทยาศาสตร์ยังมีข้อมูลสนับสนุนอยู่น้อย Yang *et al*. (1996) พบว่าน้ำต้มของเมล็ดราชดัดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในหลอดทดลอง นอกจากนี้ได้มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรบางชนิดต่อ *E. histolytica* ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองจากประเทศอินเดีย พบว่าสมุนไพรหลายชนิดที่สกัดด้วยเอธานอลมีผลต่อเชื้อบิดมีตัวในหลอดทดลองและสามารถรักษาโรคนี้ในสัตว์ทดลองได้ (Sohni *et al*., 1995; Ghoshal *et al*., 1996)

การทดลองครั้งนี้เป็นการนำเอาสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง ท้องเสีย ในตำรับยาไทยแผนโบราณมาสกัดด้วยเมธานอล (100%) และทดสอบฤทธิ์ต่อโปรโตซัวในลำไส้ 2 ชนิด คือ *E. histolytica* และ *B. hominis* โดยทำการทดสอบในหลอดทดลอง ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ พบว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. histolytica* มี 3 ชนิด คือ สารสกัดจากลูกเบญกานี ผลดีปลี และ รากชะพลู และสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในระดับต่างๆ กัน

ผักขมหนามเป็นสมุนไพรที่กล่าวถึงทั่วไปในการใช้รักษาอาการแก้บิดถ่ายเป็นเลือด (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2525) แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากรากผักขมหนามไม่มีผลต่อการเจริญของ *E. histolytica* และมีผลน้อยต่อ *B. hominis* (ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ได้เพียง 1 ตัวอย่าง และยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* บางส่วนได้ 3 ตัวอย่าง) อาจเป็นไปได้ว่าบิดถ่ายเป็นเลือดที่กล่าวถึงในตำรายาโบราณอาจเกิดจากแบคทีเรียชนิด *Shigella* sp.

เบญกานีเป็นยาฝาดสมาน ใช้แก้ท้องเสีย สารประกอบที่สำคัญคือ กรดเทนนิก และ กรดกัลลิก (อรุณพร อิฐรัตน์, 2532; สมพร หิรัญราม, 2536) ในการทดลองครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่พบว่าสารสกัดจากลูกเบญกานีสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. histolytica* และ *B. hominis* จากการตรวจเอกสารไม่พบข้อมูลทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากลูกเบญกานีต่อโปรโตซัวในลำไส้หรือเชื้ออื่นๆ มาก่อน แต่ Hwang *et al*. (2000) กล่าวว่าสารสกัดจากลูกเบญกานีมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดและไม่มีผลข้างเคียง

Ongsakul *et al*. (1993) รายงานว่า น้ำผักเบี้ยใหญ่คั้นที่ความเข้มข้นต่ำสุด 2 กรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำต้มจากผักเบี้ยใหญ่ 4 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. histolytica* ในหลอดทดลอง แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากต้นผักเบี้ยใหญ่ไม่มีผลต่อการเจริญของ *E. histolytica* ทั้งนี้อาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น วิธีการสกัด อายุพืช แหล่งที่เก็บ เป็นต้น สำหรับผลต่อ *B. hominis* นั้นพบว่าสารสกัดจากผักเบี้ยใหญ่ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* 2 ตัวอย่าง และยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* บางส่วน 4 ตัวอย่าง

Ghoshal *et al.* (1996) ทดลองสารสกัดจากผลดีปลี ต่อ *E. histolytica* พบว่าสารสกัดจากดีปลีที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถฆ่าเชื้อนี้ได้ แต่จากการทดลองครั้งนี้ สารสกัดจากผลดีปลีที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. histolytica* แต่ไม่สามารถฆ่า *E. histolytica* Tripathi *et al*. (1999) พบว่า สารสกัดจากดีปลีมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *G. lamblia* ในหลอดทดลองเช่นกัน Kaneda *et al*. (1991) รายงานว่าสารอัลคาลอยด์ที่มีในพืชมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. histolytica*, *G. lamblia* และ *T. hominis* ในหลอดทดลอง ในทดลองครั้งนี้สารสกัดจากผลดีปลีสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* 5 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1,000-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจเป็นผลจากสารอัลคาลอยด์หลายชนิดที่มีมากในผลดีปลีจึงสามารถยับยั้งการเจริญของโปรโตซัวในลำไส้ นอกจากนี้มีรายงานล่าสุดพบว่า สารสกัดจากรากดีปลีมีฤทธิ์รักษาโรคที่เกิดจาก *E. histolytica* ในหนูได้เช่นกัน (Ghoshal and Lakshmi, 2002)

Sohni *et al*. (1995) พบว่าสารสกัดจากเถาชิงช้าชาลีที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. histolytica* ได้ในหลอดทดลอง และใช้รักษาบิดในตับในหนูได้ผลสูงถึงร้อยละ 89 แต่จากการทดลองครั้งนี้ สารสกัดจากเถาชิงช้าชาลีไม่มีผลต่อการเจริญของ *E. histolytica* ในหลอดทดลอง อาจเนื่องจากสภาวะในหลอดทดลองไม่เหมาะต่อการออกฤทธิ์หรือสารสกัดที่ได้มีความเข้มข้นต่างกันเนื่องจากใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน จากการทดลองของ Varma *et al*. (1990) พบว่า สารสกัดจากรากของ *Coleus forskohlii* สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. histolytica* ได้ดีในหนูแต่ไม่ได้ผลในหลอดทดลอง ที่สอดคล้องกับการทดลองของ Chitravanshi *et al*. (1992) ที่ใช้สารสกัดจากเมล็ด ใบ ราก ดอก และต้นของต้นกรรณิการ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษาโรคบิดในหนูแต่ได้ผลน้อยในหลอดทดลอง แต่เมื่อทดลองกับ *B. hominis* พบว่าสารสกัดจากเถาชิงช้าชาลีสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้ถึง 4 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1,000-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* บางส่วน 2 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เถาชิงช้าชาลีมีสาร glucoside และ gilosterol ที่มีศักยภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ร่างกายสามารถผลิตเม็ดเลือดขาว granulocyte-macrophage เพิ่มมากขึ้น

(Thatte *et al*., 1994; Sohni and Bhatt, 1996) มีสาร cordioside, cordiofolioside A และ cordiol กระตุ้นการทำงานของ macrophage (Kapil and Sharma, 1997) ทำให้เกิดขบวนการ phagocytosis ได้มากขึ้น (Rege *et al*., 1999) ทำให้ร่างกายสามารถกำจัดเชื้อที่เข้าสู่เซลล์ได้ จึงสอดคล้องกับผลการทดลองของ Valsaraj *et al*. (1997) ที่พบว่าสารสกัดจากชิงช้าชาลีมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ และผลการทดลองของ Sohni และ Bhatt (1996) ที่พบว่าชิงช้าชาลีสามารถรักษาบิดในตับได้ ซึ่งผลเหล่านี้อาจมาจากการที่เม็ดเลือดขาวทำงานดีขึ้นจึงทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถทำลายเชื้อแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้

การทดลองในครั้งนี้พบว่าสารสกัดสมุนไพรหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. histolytica* และ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้ทั้งหมดหรือได้บางส่วน แม้ว่าการยับยั้งการเจริญของโปรโตซัวในลำไส้บางส่วน ซึ่งเป็นการลดปริมาณเชื้อลงเท่านั้น ก็ยังนับว่ามีประโยชน์เนื่องจากมีรายงานว่าการติดเชื้อ *B. hominis* เป็นจำนวนน้อยในลำไส้ ผู้ติดเชื้อก็มักจะไม่แสดงอาการของโรค (Zierdt, 1983; Zaki *et al*., 1991) ดังนั้นการใช้สมุนไพรดังกล่าวเพื่อลดปริมาณ *B. hominis* ในลำไส้ลงบางส่วนอาจเป็นการทุเลาอาการที่จะเกิดได้ ขณะนี้ยังไม่สามารถบอกได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารชนิดใด จะต้องมีการศึกษาต่อไป

จากรายงานการศึกษาหลายๆ การศึกษาที่กล่าวมาจะเห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร เช่น การใช้ตัวทำละลาย วิธีการสกัด ความรุนแรงของเชื้อแต่ละชนิด และสภาพหรือส่วนของพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ เช่น พืชสมุนไพรสดกับพืชสมุนไพรแห้ง ช่วงเวลาที่เก็บ รวมทั้งวิธีการศึกษา สายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาศึกษา

4.4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการดื้อยาสมุนไพรของโปรโตซัวในลำไส้ในหลอดทดลอง

ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการที่ *B. hominis* จะดื้อต่อสมุนไพรหรือยาที่ใช้หรือไม่นั้น พบว่า การตอบสนองต่อสมุนไพรหรือยาเมโทรนิดาโซลในการทดสอบครั้งที่ 2 ไม่ได้ต่างจากครั้งที่ 1 อย่างเห็นได้ชัดเจน มีตัวอย่างเป็นจำนวนน้อยที่ต้องใช้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือฆ่าเชื้อได้ (ตารางที่ 23 และ 24) แต่

ความแตกต่างก็มีไม่เกิน 1 ความเข้มข้น ในการศึกษานี้อาจสรุปได้ว่าในการทดสอบ 2 ครั้ง ยังไม่พบว่า *B. hominis* จะมีแนวโน้มเกิดการดื้อต่อยาหรือสารสกัดสมุนไพรที่ใช้

สำหรับปัจจัยที่ทำให้เชื้อโปรโตซัวในลำไส้เกิดการดื้อยาที่ใช้ในการรักษานั้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอน มีรายงานว่าเชื้อ *B. hominis* ที่แยกได้จากอุจจาระของชาวอินโดนีเซียจะมีความทนทานต่อยาเมโทรนิดาโซลที่ความเข้มข้นมากกว่า *B. hominis* ที่แยกได้จากอุจจาระของชาวสิงคโปร์และบังคลาเทศสูงถึง 100 เท่า (Haresh *et al*., 1999) แสดงให้เห็นว่าเชื้อจากที่ต่างๆ มีการตอบสนองต่อยาไม่เท่ากันรวมทั้งระยะต่างๆ ในวงจรชีวิตของเชื้อก็มีความทนทานต่อยาต่างกัน Zaman และ Zaki (1996) พบว่าบางครั้งระยะซีสท์ของ *B. hominis* สามารถทนทานต่อยาเมโทรนิดาโซลได้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับโปรโตซัวในลำไส้ชนิด *E. histolytica* ที่ทำให้เกิดโรคบิดมีตัวดื้อต่อยาอีเมทีน ในอัตราส่วน $1:2.5x10^{7}$ ตัว เนื่องจากเชื้อเกิดการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติ (Orozco *et al*., 1985) และพบว่าการใช้ ethyl-methanesulphonate สามารถชักนำให้ *E. histolytica* เกิดการกลายพันธุ์เป็นดื้อต่อยาอีเมทีนในความเข้มข้นที่สูงมากได้ (Prabhu *et al*., 2000)