บทที่ 4

วิธีการและผลการทดลองในสัตว์ทดลอง

4.1 หาปริมาณพิษงูที่ทำให้หนูตาย 50% (LD_{50}) โดยให้วิธีการฉีดแบบเข้าเส้นเลือด (IV) ฉีดแบบเข้ากล้ามเนื้อ (IM) และฉีดใต้ผิวหนัง (SC)

ผลการทดลอง

LD_{50} & its confidence limits ของพิษงูเห่าไทย (NK 001239) :

- IV route = 5.60 (3.85 – 8.15) μg
- IM route = 8.28 (6.73 – 10.19) μg
- SC route = 9.80 (7.31 – 13.21) μg

4.2 สารสกัดสมุนไพรที่คัดเลือก จากการทดลองในบทที่ 3 เพื่อมาทำการทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เบื้องต้นจำนวน 5 ชนิด คือ

1) เถาโคกกระออม (E015)
2) ใบโคลงเคลง (E026)
3) เปลือกสายหยุด (E048)
4) กิ่งอบเชย (E052)
5) ใบฝ้ายผี (E089*)

การเตรียมสมุนไพรไว้ใช้ในสัตว์ทดลอง (Alam และ Gomes, 2003) ดังนี้ นำสารสกัดสมุนไพรมาละลายด้วยน้ำเกลือ แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส (supernatant) เก็บไว้ใช้งานที่อุณหภูมิ 4 องศา และคำนวณน้ำหนักของสมุนไพรตามน้ำหนักของสมุนไพรสกัดแห้ง

4.3 การทดลองฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการต้านพิษงู โดยใช้สารสกัดสมุนไพรผสมกับพิษงูก่อนฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนู mice

- การทดลองที่ 1 (In *vivo* antagonist (SC route))

เตรียมพิษงูเห่าไทย (NK venom) 20 μg (2 LD_{50} of SC-route)

เติมสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมได้จากข้อ 2 ลงไป 3 ความเข้มข้น (1, 5 และ 10 mg)

↓ incubate ที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

↓ centrifuge ที่ 2000 rpm เป็นเวลา 10 min.

นำสารละลายใสส่วนบน (supernatant of venom - plant extract mixture) 0.2 มล.

ไปฉีด SC ในหนู mice หนัก 18 -20 กรัม จำนวน 4 ตัวต่อกลุ่ม

↓

สังเกตการณ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผล และนับจำนวนหนูที่ตาย หรือรอดชีวิต

(Results expressed as number of mice survived or died)

กลุ่มควบคุม (Control group)

1) ฉีดพิษงูเห่าไทยอย่างเดียวให้หนูตัวละ 20μg / 0.2 ml, SC route หนู 4 ตัวตายในช่วงเวลา 40-50 นาทีหลังฉีดพิษ
2) ฉีดสารสกัดสมุนไพรอย่างเดียวขนาด 1, 5 และ 10 mg / 0.2 ml / each mice, SC route กลุ่มละ 4 ตัว ผลคือ หนูรอดหมด

- ผลการทดลองที่ 1

SAMPLE + COBRA VENOM 20 μg	Doses of plant extract (mg)		
	1	5	10
E015	4 D	4 D	4 D
E026	4 D	4 S	4 S
E048	4 D	4 D	4 D
E052	4S	4 S	4 S
E089*	4 D	4 D	4 D

หมายเหตุ : S = Survivor, D = Death

- การทดลองที่ 2 นำสารสกัดสมุนไพร E026 ที่ให้ผลการทดลอง 3.1 ที่ดี มาทดลองเพิ่มเติมดังนี้

Plant extract (5 & 10 mg) + varying doses of cobra venom

↓ incubate 37 ^{o}C 1 hr.,

↓ centrifuge 2,000 rpm 10 min.

supernatant of venom - plant extract mixture

injected 0.2 ml / mice 18-20 g., SC route, 8 mice / group

observed 24 hr.

- ผลการทดลองที่ 2

Plant extract (mg)		Cobra venom (μg)*	Fold of neutralization (LD_{50})
E 026	5	44.55	4.55
	10	49.96	5.10

Note : * Defined as the neutralizing potency of each plant extract which 50 % of mice survived when the venom doses increased (μg)

- วิจารณ์ผลการทดลอง (In *vitro* antagonist)

ในการทดลองที่ 4.1 ปริมาณของพิษงูเห่าไทย 20 μg (2 LD_{50} , จากผลการทดลองที่ 1; LD_{50} = 9.80 (7.31 – 13.21 μg) SC route) เป็นปริมาณพิษงูที่มีผลทำให้หนูตาย 100 % เมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ภายในเวลา 40 – 50 นาที (กลุ่ม control-1) เมื่อนำ pre-incubated mixtures ระหว่างพิษงูเห่าไทยในปริมาณคงที่ 20 μg ผสมกับสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดที่เลือกมาทำการทดลองประสิทธิภาพเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสมุนไพรเป็น 1, 5, และ 10 มก. ตามวิธีการเตรียมสารละลายสมุนไพรในวิธีการที่ 2 ปรากฏว่าหนูขาวรอดชีวิตทั้งหมดในกลุ่มสมุนไพร E026 ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มก. และ E052 ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มก. และในกลุ่ม control-2 ซึ่งฉีดเฉพาะสมุนไพรอย่างเดียวขนาด 1, 5 และ 10 มก.

เพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้นถึงความเป็นพิษของสมุนไพร ซึ่งรายงานผลเป็นอัตราการตายและรอดหลังได้รับการฉีดสมุนไพรเข้าใต้ผิวหนังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏว่าสมุนไพรที่คัดเลือกมาทั้งห้าตัวอย่างนี้ไม่แสดงถึงความเป็นพิษเพราะหนูรอดชีวิตทั้งหมด และในกลุ่ม control-2 หนูที่รอดชีวิตหลัง 24 ชม. ได้เก็บไว้ดูอาการต่ออีกจนครบ 72 ชม. ซึ่งหนูรอดชีวิตทั้งหมดเช่นกัน

จากการทดลองนี้ทำให้ทราบปริมาณความเข้มข้นของสมุนไพรที่คาดว่าน่าจะปลอดภัยและไม่ทำให้หนูตายเนื่องจากได้รับสมุนไพรในปริมาณที่มากเกินไปในการทดลองขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นการทดสอบในเบื้องต้นว่าสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้ ชนิดใดให้ผลในการยับยั้งพิษงูเห่าไทยที่ 2 LD_{50} ซึ่งเป็นปริมาณขั้นต่ำในการทำให้หนูตาย 100 % เมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

การทดลองที่ 2 ซึ่งนำผลการเลือกสมุนไพรจากผลการทดลองที่ 1 คือสมุนไพร E026 ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มก. มาทำการทดลองซ้ำในการทดลองที่ 2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสูงสุด (neutralizing potency : ED_{50}) ในการยับยั้งพิษงูเห่าไทย โดยการเพิ่มปริมาณพิษงูมากกว่า 20 μg จนถึงระดับที่ทำให้หนูตาย 50 % ผลจากตาราง 3.2 จะได้ว่าสมุนไพร E026 ให้ผลที่ดี โดยที่เมื่อใช้สมุนไพรเพียง 5 และ 10 มก. ยับยั้งพิษงูเห่าไทยได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ 5 LD_{50}

4.4 การทดลองฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการต้านพิษงู โดยฉีดพิษงูเข้าใต้ผิวหนังของหนู mice ก่อนที่จะฉีดสารสกัดจากสมุนไพร

วิธีการทดลอง ฉีดพิษงูเห่าไทยขนาด 40 μg (4 LD_{50}) เข้าใต้ผิวหนังของหนู mice น้ำหนัก 18-20 กรัมกลุ่มละ 2 ตัว แล้ว ตามด้วยการฉีดสารสกัดสมุนไพร E026 ในขนาด 1 และ 2 mg เข้าใต้ผิวหนังบริเวณที่ฉีดพิษงูเห่าไทย ณ เวลาต่าง ๆ กัน สังเกตการณ์และจับเวลาเป็นนาทีที่หนู mice มีชีวิตรอด รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย (นาที)

- ผลการทดลอง

cobra venom (μg)	conc. of E026 (mg)	minutes after venom injection	Survival time (min.)
40	1	0	64
		5	46
		10	37
		30	40
40	2	0	77
		5	46
		10	33
		30	40
40	-	-	30

4.5 การทดลองฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการต้านพิษงู โดยฉีดพิษงูเข้าใต้ผิวหนังของหนู mice ก่อนที่จะป้อนสารสกัดจากสมุนไพร

วิธีการทดลอง ฉีดพิษงูเห่าไทยขนาด 20 μg (2 LD_{50}) เข้าบริเวณใต้ผิวหนังของหนู แล้วตามด้วยการป้อนสารสกัดจากสมุนไพร E 026 ขนาด 5 และ 10 mg ทันที (ทดลองนี้ทำในหนูขาวน้ำหนัก 18-20 กรัม กลุ่มละ 2 ตัว) ได้ผลดังนี้

- ผลการทดลอง

cobra venom (μg)	Plant extract	Dosage of plant extract (mg)	Survival time (min.)
20	-	-	35
20	E 026	5	55
		10	50

4.6 วิจารณ์ผลการทดลองที่ 4.4 และ 4.5 (In *vivo* antagonist)

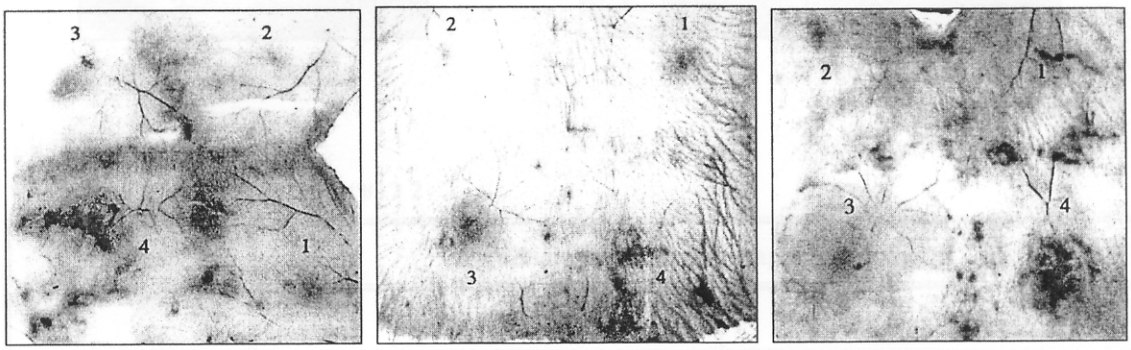
การทดลองตามวิธีการที่ 4 และ 5 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในสัตว์ทดลองเพื่อให้ใกล้เคียงกับเหตุการณ์จริงกับการถูกงูกัด โดยการฉีดพิษงูเห่าไทย 20 มก.แล้วจึงป้อนสมุนไพรขนาด 5 และ 10 มก.ให้กับหนูขาวที่ถูกฉีดพิษ หนูทุกกลุ่มตายหมด สารสกัดสมุนไพรช่วยยืดระยะการมีชีวิตให้นานขึ้นเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับพิษงูเห่าไทยเพียงอย่างเดียว (ตาราง 4) ซึ่งผลการทดลองที่ 5 ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน แต่กลุ่มหนูที่ได้รับการฉีดสมุนไพรทันทีหลังการฉีดพิษมีชีวิตได้นานกว่ากลุ่มซึ่งได้รับการฉีดสารสกัดสมุนไพร 30 นาทีหลังการฉีดพิษงู

จากผลการทดลองที่ 4.3 – 4.5 ในการใช้สารสกัดสมุนไพรต้านฤทธิ์ของพิษงูเห่าไทย อยู่ในเกณฑ์ที่ยังไม่น่าเป็นที่ยอมรับ ซึ่งได้ผลสูงสุดของ E 026 เพียง 5 LD_{50}

4.7 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อระบบเลือดในหนู และกระต่าย (Hemorrhagic test in mouse and rabbit)

- การทดลองในหนูขาว 1

นำสารสกัดสมุนไพร E025 มาทดสอบการต้านพิษงูกะปะ(MPV venom) ที่ก่อให้เกิดจุดเลือดออกบริเวณที่ถูกกัด ในหนูขาวน้ำหนัก 20-25 กรัม จำนวน 3 ตัว



mice 1 mice 2 mice 3

- ผลการทดลองในหนูขาว 1

Site	Diameter of hemorrhagic spot (cm.)		
	mice 1	mice 2	Mice 3
1	0.3 x 0.2	0.3 x 0.2	0.1 x 0.3
2	0.1 x 0.1	0.1 x 0.1	small dot
3	0.4 x 0.4	0.3 x 0.3	0.2 x 0.2
4	0.4 x 0.4*	0.5 x 0.4*	0.5 x 0.5*

Note : * with diffuse hemorrhage

Site 1 = MPV venom 10 μg + E 025 5 mg.

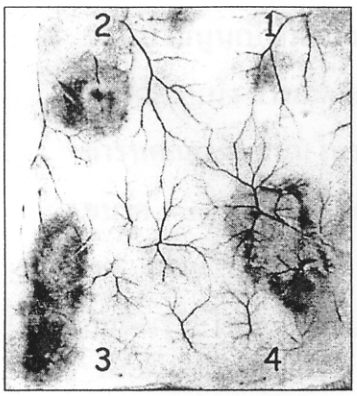
Site 2 = MPV venom 10 μg + E 025 1 mg.

Site 3 = E 025 5 mg.

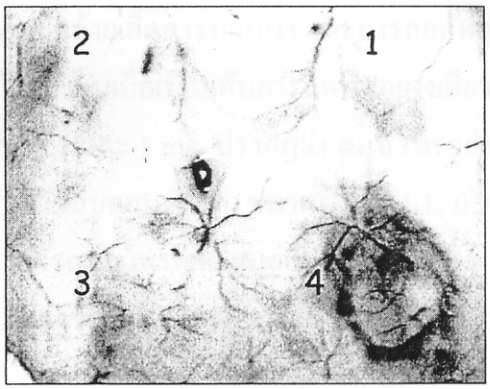
Site 4 = MPV venom 10 μg

- การทดลองในหนูขาว 2

เปรียบเทียบสารสกัดสมุนไพร E025 และ E026 ในการทดสอบการต้านพิษงูกะปะ(MPV venom) ที่ก่อให้เกิดจุดเลือดออกบริเวณที่ถูกกัด ในหนูขาวน้ำหนัก 20-25 กรัม



E 025



E 026

- ผลการทดลองในหนูขาว 2

Site	Diameter of hemorrhagic spot (cm.)	
	E 025	E 026
1	0.3 x 0.3	No hemorrhage
2	0.8 x 0.8	No hemorrhage
3	0.7 x 1.2	No hemorrhage
4	1.0 x 1.6	1.2 x 1.3

Note : Site 1 MPV venom 10 μg + E 025 / E 026 1 mg

Site 2 MPV venom 10 μg + E 025 / E 026 0.5 mg

Site 3 MPV venom 10 μg + E 025 / E 026 0.25 mg

Site 4 MPV venom 10 μg

เมื่อนำสมุนไพรที่คัดเลือกมา 5 ตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1 และ 5 mg) มาทำการทดลอง แล้วได้ผลการทดลองดังนี้

MPV 10 mg + Plant Extract	Diameter of hemorrhagic spot (cm.)	
	conc. 1 mg	conc. 5 mg
E015	0.2 x 0.3, no hemorrahge	no hemorrahge
E048	0.5 x 0.5, no hemorrahge	no hemorrhage
E052	0.6 x 0.6, 0.3 x 0.4@	0.8 x 0.8, 0.9 x 0.9@
E089*	- - --, - - - -	---- , 0.5 x 0.5 # (ใช้สมุนไพร 2 mg)
MPV 10 μg (control)	0.8 x 0.7, 1.0 x 0.8, 0.8 x 0.8 with diffused hemorrhage	

Note : @ ขอบบวมนูนเป็นวงกลมชัดเจน ลักษณะคล้ายเกิดการบวมน้ำ และการลอกหลุดของชั้นใต้ผิวหนัง การเกิด hemorrhage ไม่ชัดเจนเมื่อเทียบกับการฉีดพิษอย่างเดียว จึงทำการทดลองฉีดสมุนไพรอย่างเดียวขนาด 1 และ 5 mg ปรากฏว่า สมุนไพรอย่างเดียวขนาด 5 mg นทำให้เกิดลักษณะบวมน้ำขอบกลมชัดเจน ขนาด 1.1 x 1.1, 0.9 x 0.9 cm. ไม่แน่ใจว่าเป็นการระคายเคืองจากตัวสมุนไพรต่อเยื่อบุอ่อน

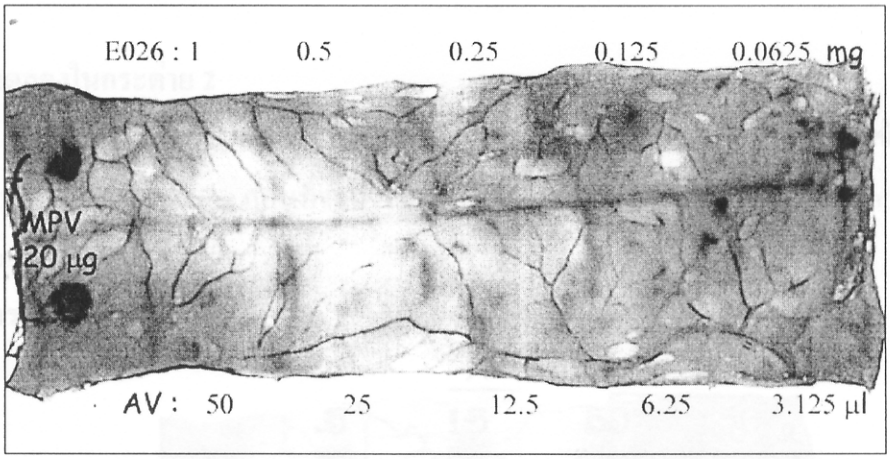
\# ลักษณะไม่ใช่ hemorrhage น่าจะเป็นสีแดงของสมุนไพรมากกว่า

- การทดลองในกระต่าย 1

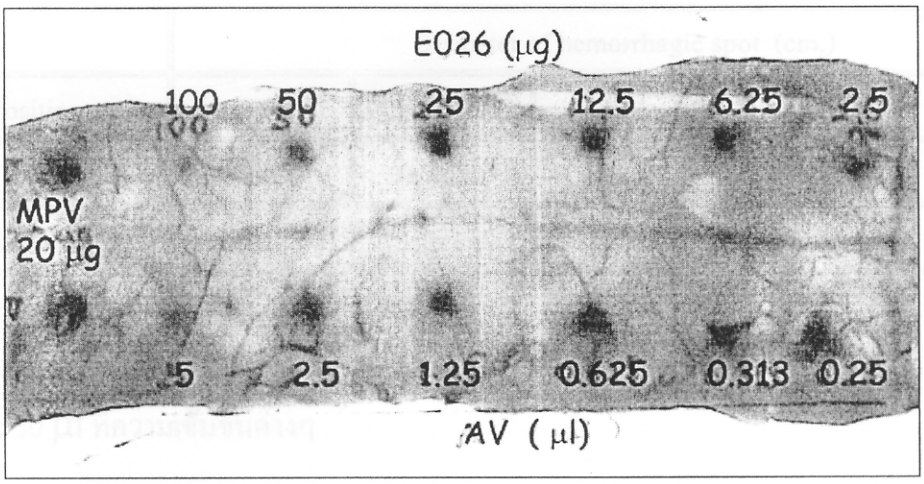
ผสมพิษงูกะปะ 20 μg (MPV) กับสารสกัดสมุนไพร E026 หรือเซรุ่มแก้พิษงูกะปะ (MPV-AV) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทิ้งไว้ที่ 37°C 1 ชั่วโมง แล้วจึงฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่ายจุดละ 0.1 ml สังเกตผลการทดลอง

- ผลการทดลองในกระต่าย 1

1. MPV- E 026 mixture (conc. 0.0625 – 1 mg) และ MPV-MPV-AV mixture (3.125 – 50 μl) ให้ผล negative คือไม่ก่อให้เกิด hemorrhagic spot



2. MPV-E 026 mixture (conc. 2.5 – 100 μg) และ MPV-MPV-AV mixture (conc. 0.25 – 5 μl) ให้ผล positive คือเกิด hemorrhagic spot ดังนี้



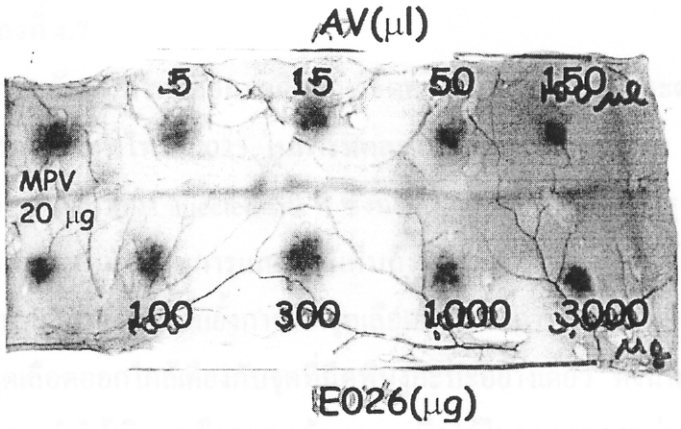
	Diameter of hemorrhagic spot (cm.)						
Position	1	2	3	4	5	6	7
E 026	1.2x1.0*	--	0.6x0.6	0.9x0.8	0.9x0.7	0.7x0.8	0.6x1.5*
MPV-AV	1.2x1.2*	0.5x0.5	0.9x1.0*	0.7x0.7*	0.9x0.8*	0.8x0.8*	1.3x1.3*

Note : * with diffuse hemorrhage

- การทดลองในกระต่าย 2

1. เตรียมสารสกัดสมุนไพร E026 และเซรุ่มแก้พิษงูกะปะ MPV-AV ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำผสมกับ Lanolin 50 mg ก่อนที่จะนำไปทาบริเวณที่ฉีดพิษงูกะปะ 20 μg / 0.1 ml, ID route, Rabbit skin

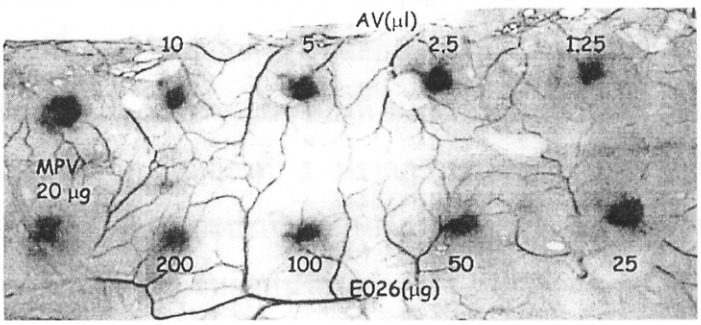
- ผลการทดลองในกระต่าย 2



	Diameter of hemorrhagic spot (cm.)				
Position	1	2	3	4	5
E 026	0.9x0.7	0.7x0.8	1.0x1.1	0.7x1.0	0.7x0.8
MPV-AV	1.4x1.1	1.0x1.0	0.9x0.9	0.7x0.8	0.6x0.8

2. ฉีดพิษงูกะปะ 20 μg / 0.1 ml ID route ตามด้วยการฉีด MPV-AV และ E026 ID route 4 จุดๆละ 50 μl ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลอง



1 2 3 4 5

	Diameter of hemorrhagic spot (cm.)				
Position	1	2	3	4	5
E 026	1.0x1.0	0.8x0.8	1.0x0.6	0.9x0.6	1.0x0.9
MPV-AV	1.0x1.0	0.6x0.7	0.8x0.8	0.8x0.8	0.8x0.7

4.8 วิจารณ์ผลการทดลองที่ 4.7

(ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการเกิดจุดเลือดออกในหนูขาว และกระต่าย)

การทดสอบสารสกัดสมุนไพร E025 ในการทดลองในหนูขาว 1 ผลของ injected site 1 และ 2 ในหนูทั้ง 3 ตัวมีขนาดเล็กกว่า injected site 4 ซึ่งฉีดพิษงูกะปะอย่างเดียว (รูปที่ 1 – 3) และเมื่อลดความเข้มข้นให้ต่ำกว่า 1 มก. เป็นการแสดงให้เห็นถึงขบวนการในการทำให้เกิดเนื้อตายของพิษงูกะปะ และผลของสมุนไพรต่อการยับยั้งการเกิดจุดเลือดออก ในการทดลองกับหนูขาว 2 (รูปที่ 4) ปรากฏว่ายังคงเกิดจุดเลือดออกใกล้เคียงกับจุดที่ฉีดพิษงูกะปะอย่างเดียว ดังนั้นE025 อาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งพิษงูกะปะในการทำให้เกิดจุดเลือดออกน้อยลง เมื่อใช้ในขนาดมากกว่า 1 มก.ขึ้นไป กล่าวคือมีผลต่อการลดความรุนแรงของการเกิดจุดเลือดออกเท่านั้น สำหรับสารสกัดสมุนไพร E026 จะให้ผลที่ดีกว่า E025 จากการทดลองกับหนูขาว 2 ซึ่งไม่ปรากฏร่องรอยของการเกิดจุด

เลือดออกเลยในจุดที่ 1 และ 2 และมีเพียงเล็กน้อยในจุดที่ 3 (รูปที่ 5) ซึ่งใช้สารสกัดสมุนไพร E026 เพียง 0.25 มก. (รอยสีเหลืองจางๆในรูปที่ 5 เป็นสีของสารสกัดสมุนไพร) สำหรับสารสกัดสมุนไพร E015, E048 และ E089* ก็ให้ผลการทดลองที่ดีคือเกิดเป็นจุดเลือดออกเพียงเล็กน้อยเมื่อให้สมุนไพรในขนาด 1 mg และไม่เกิดจุดเลือดออกเลยเมื่อใช้สมุนไพรในขนาด 5 mg (สำหรับ E089* ใช้เพียง 2 mg) ส่วนสารสกัดจากสมุนไพร E052 ทำให้เกิดรอยบวมนูนแดงขึ้นมาบริเวณที่ฉีด (ไม่ใช่จุดเลือดออก) ซึ่งผลดังกล่าวเกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นว่ารอยบวมนูนแดงนี้อาจเกิดจากผิวของสัตว์ทดลองแพ้จากสารที่อยู่ในสมุนไพร

การทดลองภาวะการณ์เกิดจุดเลือดออกกับกระต่ายนั้น เป็นการเปรียบเทียบกับเซรุ่มแก้พิษงูกะปะของสถานเสาวภาในการยับยั้งการเกิดจุดเลือดออกจากพิษงูกะปะ ซึ่ง E026 ให้ผลดีในการยับยั้งการเกิดจุดเลือดออกที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 μg ขึ้นไป เปรียบเทียบกับเซรุ่มแก้พิษงูกะปะที่ 6.25 μl ขึ้นไป (รูปที่ 6 – 7) แต่เมื่อทำการทดลองผสมในรูปแบบครีมของ E026 และเซรุ่ม ทาบริเวณที่ฉีดพิษงูกะปะ 20 μg ในการการทดลองที่ 1 และการฉีดสารละลาย E026 และเซรุ่มทันทีตรงบริเวณที่ฉีดพิษงูกะปะในการทดลองที่ 2 ปรากฏว่าขนาดของการเกิดจุดเลือดออกมีขนาดเท่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับจุดที่ฉีดพิษงูกะปะเพียงอย่างเดียว อาจจะเป็นไปได้ว่าการดูดซึมของสารสกัดสมุนไพรและเซรุ่มแก้พิษงูจากชั้นผิวหนังกระต่ายไม่ดี

การเกิดจุดเลือดออกในผู้ป่วยรายที่ถูกงูกะปะกัดเป็นอาการเบื้องต้นของการเกิดเนื้อตายในบริเวณที่ถูกกัด การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการเกิดจุดเลือดออกจึงเป็นวิธีการบ่งชี้ได้ว่าสมุนไพรนั้นๆมีฤทธิ์ต้านพิษงูกะปะหรือไม่

การทดลองสารสกัดสมุนไพรในสัตว์ทดลองทั้งหมดนี้ ใช้วิธีการทดลองที่ง่ายและทำซ้ำหรือใช้สัตว์ในแต่ละการทดลองไม่มาก เนื่องจากเป็นการทดสอบในเบื้องต้น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการทำการทดลองในเชิงลึกในอนาคต เมื่อกลุ่มนักวิจัยตัดสินใจเลือกสารสกัดสมุนไพรที่ดีที่สุดจากงานวิจัยนี้มาทำซ้ำ จะต้องมีการทำการทดลองในสัตว์ทดลองจำนวนมากกว่านี้ทั้งในแง่ของวิธีการทดลอง จำนวนสัตว์ที่ใช้ในแต่ละการทดลอง รวมถึงสารสกัดสมุนไพรก็ต้องมีการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นในเรื่องของสีและการละลาย เนื่องจากสีของสารสกัดสมุนไพรอาจขัดขวางการอ่านผลการทดสอบบางอย่างในสัตว์ทดลอง การละลายที่ไม่ดีก็มีผลต่อการเตรียมความเข้มข้นของสมุนไพรให้คงที่ในการทดสอบทุกครั้ง