

การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรใบกฤษณา

เบญจมาศ อินทรบุตร* ญาณิน ลิ้มปานนท์** อัจฉรา แก้วน้อย***

* สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ

** ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันสังคมและสิ่งแวดล้อม คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

*** สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ

Corresponding author e-mail : atchara_a@bsru.mail.go.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria subintegra* ต่อดับ และไต โดยใช้หนูไมซ์สายพันธุ์ ICR จำนวน 80 ตัว (เพศผู้ 40 ตัว เพศเมีย 40 ตัว) โดยแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ป้อนด้วยน้ำกลั่นในปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มทดลอง ป้อนด้วยสมุนไพรใบกฤษณาขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 3 เดือน ผลการทดลองพบว่า สมุนไพรใบกฤษณาไม่เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไป ไม่เปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ไม่มีผลต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในที่ศึกษา รวมทั้งไม่พบความผิดปกติทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในทั้งหมด (ไต ตับ และม้าม) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ค่าเคมีคลินิกของเลือด ในหนูเพศผู้กลุ่มทดลอง พบว่าเมื่อป้อนสมุนไพรขนาด 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทำให้ค่า Alanine transaminase และ Blood urea nitrogen ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อป้อนสมุนไพรขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทำให้ค่า Alkaline phosphatase เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้าม หนูเพศเมียกลุ่มทดลอง พบว่าเมื่อป้อนสมุนไพรขนาด 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทำให้ค่า Cholesterol และ Creatinine เพิ่มขึ้น ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ค่า Alkaline phosphatase ลดลงทุกกลุ่มทดลอง อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับค่าอ้างอิง พบว่ายังอยู่ในช่วงวิสัยปกติ ดังนั้น ผลจากการวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า สมุนไพรใบกฤษณาที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ไม่พบพิษกึ่งเรื้อรังที่ชัดเจนแตกต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อป้อนให้หนูต่อเนื่องเป็นเวลานาน 3 เดือน

คำสำคัญ : สมุนไพรใบกฤษณา/ พิษกึ่งเรื้อรัง

Subchronic toxicity studies of *Aquilaria subintegra* Ding Hau leaves

Benjamas Intharabut^{*} Yanin Limpanont^{**} Atchara Kaewnoi^{***}

^{*} Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok

^{**} Department of Social and Environmental Medicine, Faculty of Tropical medicine, Mahidol University, Bangkok

^{***} Thai Traditional Program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok

Corresponding author e-mail : atchara_a@bsru.mail.go.th

ABSTRACT

The objective of this research was studies the toxicity of *Aquilaria subintegra* leaves which effected to liver and kidney of ICR mouse strains. The 80 mice (40 male, 40 female) were divided into four groups. The group 1 (control) were fed with 0.2 ml distilled water and the group 2-4 (experimental groups) which *A. subintegra* were given at the doses of 0.05, 0.1 and 0.2 g/kg BW/day, respectively for 3 months. The results showed no significant effect on behavior change, average body weight, relative organs weight and histopathology of organs (kidneys, liver and spleen) when compared with the control ($p < 0.05$). The results of biochemistry indicated that the level of Alanine transaminase (ALT or alanine animotransferase) and Blood urea nitrogen were decreased in the male experimental group which *A. subintegra* at 0.05 g/kg BW/day were fed but Alkaline phosphatase were increased when fed with 0.1 g/kg BW/day. On the other hand, in the female experimental group Cholesterol and Creatinine were increased when fed with 0.1 and 0.2 g/kg BW/day respectively, whereas Alkaline phosphatase were decreased in all experimental groups. However the values were within the normal ranges. This study can be concluded that concentration of *Aquilaria subintegra* leaves powder at 0.05, 0.1 and 0.2 g/kg BW/day are not demonstrated the sub chronic toxicity after continue taking for three months.

Keywords : *Aquilaria subintegra* leaves/ subchronic toxicity

บทนำ

การศึกษาถึงประโยชน์และพิษของสมุนไพรไทยในปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก แต่พบว่าสมุนไพรส่วนใหญ่ยังขาดข้อมูลในการสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ จึงจำเป็นจะต้องมีการพัฒนาและยกระดับยาสมุนไพรให้เป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติอย่างจริงจัง และควรเร่งให้มีการศึกษาวิจัย และมีเอกสารงานวิจัยมากขึ้น รวมทั้งจัดระบบฐานข้อมูลการใช้สมุนไพรให้สามารถสืบค้นได้โดยสะดวก มีมาตรฐานเป็นสากลมากขึ้น (คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ, 2555) ซึ่งจะนำไปสู่การพึ่งตนเองทางสาธารณสุขและทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะการศึกษาถึงความปลอดภัยในการใช้สมุนไพรควรจะมีการศึกษาในสัตว์ทดลองก่อนที่จะใช้กับมนุษย์ (Pre-clinic) ให้ครบถ้วน เริ่มตั้งแต่ศึกษาความเป็นพิษในเซลล์ของสัตว์ทดลองทั้งพิษแบบเฉียบพลัน พิษแบบกึ่งเฉียบพลัน พิษแบบเรื้อรัง และพิษแบบกึ่งเรื้อรัง ฯลฯ รวมถึงองค์ประกอบทางเคมีที่ทำให้เกิดพิษนั้นด้วยแล้วจึงศึกษาทางคลินิกต่อไป

กฤษณา (*Aquilaria subintegra*) อยู่ในวงศ์ Thymelaeaceae เจริญเติบโตได้ในแทบทุกพื้นที่ของประเทศไทย แต่พบมากที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ จังหวัดระยอง จันทบุรีและตราด ขั้นตอนในการผลิตเพื่อให้ได้ไม้หอมกฤษณาที่มีคุณภาพดีนั้นจะต้องรอให้ไม้กฤษณาที่มีอายุ 5-7 ปี แล้วจึงกระตุ้นให้เกิดสารกฤษณาในเนื้อไม้ ซึ่งสารกฤษณาที่พบในเนื้อไม้เกิดจากกระบวนการหลั่งสารบางชนิดของต้นกฤษณาเพื่อมารักษาบาดแผลที่เกิดขึ้น (กรมพัฒนาแพทย์ทางเลือก, 2551) ในปัจจุบันจึงได้มีการพยายามนำส่วนอื่นๆ จากกฤษณามาใช้ให้เกิดประโยชน์ นอกเหนือจากแก่นไม้กฤษณา ตัวอย่างเช่น ซากจากใบกฤษณา จากการศึกษาความเป็นพิษของกฤษณาโดยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ของ อัจฉรา แก้วน้อย และคณะ (2552) ที่ได้ทำการศึกษาโดยพิสูจน์ฤทธิ์ของสมุนไพรใบกฤษณาในการต้านโรคเบาหวาน โดยทดสอบฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและ

หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวาน ของสมุนไพรใบกฤษณาที่สกัดด้วยน้ำร้อนและทำให้แห้งโดยความเย็น พบว่าใบกฤษณาที่สกัดด้วยน้ำร้อนสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูเบาหวานได้ และจากการศึกษาเบื้องต้นของ สุชาติดา มานอก และคณะ (2553) ได้ศึกษาสารประกอบทางเคมีในใบกฤษณาและการออกฤทธิ์โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH) ของสารสกัดจากใบกฤษณา (*Aquilaria subintegra* Ding Hau) ที่สกัดโดยเทคนิคการสกัดแบบลำดับขั้น (Sequential extraction) พบว่าใบกฤษณาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด และถูกคัดเลือกเพื่อทำการศึกษาส่วนที่แยกสกัด นำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบกฤษณายังมีอยู่น้อยและไม่เพียงพอที่จะสรุปถึงความปลอดภัยสำหรับการใช้สมุนไพรนี้ เนื่องจากประชาชนที่นำสมุนไพรจากใบกฤษณามาใช้ เช่น ซากกฤษณา หรือในรูปของแคปซูล มักได้รับประทานอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์หรือทานต่อเนื่องเป็นปี ซึ่งอาจก่อให้เกิดพิษแบบกึ่งเฉียบพลันหรือกึ่งเรื้อรังได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังเมื่อให้สมุนไพรใบกฤษณาแก่หนูไมซ์สายพันธุ์ ICR ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 3 เดือน พร้อมศึกษาความผิดปกติต่างๆ ของอวัยวะภายใน และส่วนประกอบต่างๆ ในเลือด ซึ่งจะสรุปได้ถึงข้อมูลของความเป็นพิษของสารสกัดใบกฤษณาเมื่อบริโภคในระยะยาวในหนูไมซ์ และความสัมพันธ์ของขนาดของสารสกัดใบกฤษณาและการตอบสนองผลของความเป็นพิษ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกำหนดขนาดการใช้สารสกัดใบกฤษณาในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้และยังสามารถนำไปเผยแพร่ให้กับกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ผลิตและจำหน่ายสมุนไพรกฤษณาในรูปแบบผงและแคปซูล และชาวผมรวมทั้งผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าวด้วย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรใบกฤษณาต่อโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของตับ ไต และม้าม และต่อการทำงานของตับ และไต เป็นวัตถุประสงค์หลักแล้ว ยังได้ศึกษาพฤติกรรม น้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลง น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ภายใน เป็นวัตถุประสงค์ร่วม โดยศึกษาในหนูไม่ซั้งเพศผู้และเพศเมีย

สมมติฐานการวิจัย

การได้รับสมุนไพรใบกฤษณาโดยการรับประทานในขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลานาน 3 เดือน ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะภายในได้ โดยตรวจสอบผลต่อการทำงานของตับ และไต จากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ Alanine transaminase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST) และ Bilirubin ซึ่งบ่งบอกการทำงานของตับ ระดับของ Blood urea nitrogen (BUN), Creatinine และ Alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งบ่งบอกการทำงานของไต ส่วนผลต่อโครงสร้างของอวัยวะดังกล่าวสามารถศึกษาได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคซึ่งศึกษาได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

ขอบเขตของการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง ใช้หนูทดลองสายพันธุ์ ICR Mouse จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. สมุนไพร สมุนไพรที่นำมาใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ เป็นผงสมุนไพรจากใบกฤษณา โดยเลือกเก็บใบที่ 1 ถึงใบที่ 10 นับจากปลายยอด มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำมาสับหยาบแล้วนำเข้าเตาอบให้แห้งสนิท จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพรอัตโนมัติ แล้วนำไปร่อนด้วยร่อนเบอร์ 60

3. การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรัง ทดสอบความเป็นพิษโดยการป้อนทางปาก เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยแบ่งสัตว์ทดลองแบบสุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบสมุนไพรที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ขนาดความเข้มข้นของสมุนไพรเทียบเท่ากับการบริโภคในคน กลุ่มที่ขนาดความเข้มข้นของสมุนไพรสูงกว่าสองเท่า และสี่เท่า ที่มีรายงานการบริโภคในคน (ข้อมูลจากการสอบถามประชาชนที่บริโภคอยู่เป็นประจำ) ตามลำดับ โดยเลี้ยงหนูทดลองภายใต้สภาวะเดียวกันตลอดระยะเวลา 3 เดือนโดยการป้อนสมุนไพรใบกฤษณาให้หนูทุกวันตามความเข้มข้นที่กำหนดวันละ 1 ครั้ง สังเกตอาการที่เกิดจากพิษและพฤติกรรมทุกวัน ทำการบันทึกน้ำหนักหนูแต่ละตัวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ดูแลสุขภาพการเจริญเติบโต เมื่อครบกำหนดเวลา ทำให้หนูสลบด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วเจาะเลือดจากหัวใจเพื่อนำไปตรวจสอบทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี ทำการผ่าซากตรวจสอบและตัดอวัยวะภายในเพื่อทำการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา

4. ขอบเขตของการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรัง ดังนี้ (OECD No.408, 1999)

1) สังเกตอาการที่เกิดจากพิษของสมุนไพร เช่น อาการทางผิวหนังและสภาพขน ตา เยื่อต่างๆ ระบบหายใจ และระบบเลือด เป็นต้น (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว และคณะ, 2539; Ballantyne *et al.*, 2000) และพฤติกรรมในสัตว์ทดลองที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณาในขนาดต่างๆ กันอย่างใกล้ชิดทุกวัน ทำการบันทึกน้ำหนักหนูแต่ละตัวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตลอดการทดลอง

2) การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรกฤษณาต่อการทำงานของระบบโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมี หลังจากป้อนสมุนไพรครบระยะเวลาทดลอง ทำให้หนูสลบด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) หลังจากนั้นเปิดช่องท้องและช่องอก เก็บเลือดจากหัวใจ เพื่อส่งตรวจทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี ได้แก่ ค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete blood count: CBC) ตรวจวิเคราะห์ค่าการทำงานของตับ

และไต โดยวัดระดับเอนไซม์ ALT, AST และ Bilirubin เพื่อบ่งบอกการทำงานของตับ และวัดระดับ BUN, ALP และ Creatinine เพื่อบ่งบอกการทำงานของไต รวมถึงตรวจวัดระดับกลูโคส และค่าโคเรสเตอรอลเพื่อแสดงค่าระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดเทียบกับกลุ่มควบคุม

3) การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรฤๅษณาต่อโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของอวัยวะภายใน โดยเมื่อครบกำหนดระยะเวลาการทดลองแล้ว ทำให้หนูสลบด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นเปิดช่องท้องและช่องอก เก็บอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ไต และม้าม โดยนำมาเข้ากระบวนการตัดย้อมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์สำหรับหัวใจ ปอด และกระเพาะอาหาร นำมาชั่งน้ำหนักเพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิธีการวิจัย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง ใช้หนูเม้าส์ สายพันธุ์ ICR อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-45 กรัม จำนวน 80 ตัว เป็นเพศผู้ 40 ตัว เพศเมีย 40 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล พักสัตว์ทดลองที่หน่วยสัตว์ทดลอง คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล 1 สัปดาห์ ก่อนเริ่มป้อนสมุนไพร แบ่งกลุ่มโดยการสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว) (OECD No.408, 1999) เลี้ยงหนูทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปมาตรฐานและน้ำสะอาดตามต้องการ เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยขั้นตอนในการเลี้ยงและปฏิบัติต่อสัตว์ทดลอง ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาค้นคว้า คณะเวชศาสตร์เขตร้อน เลขที่อนุญาต FTM-ACUC 003/2014

วิธีการเตรียมสมุนไพรฤๅษณา

ใบฤๅษณาของไร่ฟ้าวารี จังหวัดลพบุรี ที่เก็บในช่วงเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ 2557 โดยเลือกเก็บ

ใบที่ 1 ถึงใบที่ 10 นับจากปลายยอด มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำมาสับหยาบแล้วทำให้แห้งด้วยตู้อบ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดยาสมุนไพรอัตโนมัติ สมุนไพรผงที่ได้ นำไปร่อนด้วยแรนเบอร์ 60 เพื่อให้ได้ใบฤๅษณาผง เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

ก่อนการป้อนทุกครั้งต้องหาปริมาณสมุนไพรที่จะใช้จริงในแต่ละครั้ง จากการคำนวณตามน้ำหนักหนูแต่ละตัว และแต่ละกลุ่มความเข้มข้น แล้วจึงเตรียมสมุนไพรโดยละลายผงสมุนไพรใบฤๅษณาในน้ำกลั่นให้อยู่ในรูป Stock solution สำหรับใช้ในกลุ่ทดลองทั้ง 3 กลุ่ม คือ 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 150, 300 และ 500 มิลลิกรัม/20 มิลลิลิตร ตามลำดับ

การเลือกกำหนดขนาดสมุนไพรใบฤๅษณาสำหรับสัตว์ทดลอง

จากการสอบถามประชาชนในเขตที่มีการใช้สมุนไพรใบฤๅษณากันอย่างแพร่หลาย ในแถบจังหวัดลพบุรี ที่มีความเชื่อว่าการรับประทานสมุนไพรฤๅษณาที่มีขายในรูปของแคปซูลนั้นจะสามารถลดปริมาณน้ำตาลในเลือดได้ โดยรับประทานวันละ 2.5 กรัม/วัน/คน (หนัก 50 กิโลกรัม) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ได้กำหนดขนาดความเข้มข้นต่ำสุดสำหรับทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังไว้ที่ 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน และเพิ่มขนาดความเข้มข้นเป็น 2 เท่า (0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน) และ 4 เท่า (0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน) ของขนาดที่มีรายงานการใช้ในคน ซึ่งเป็นขนาดที่คณะกรรมการขององค์การด้านการร่วมมือทางเศรษฐกิจและพัฒนามหาหรือ OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) แนะนำให้ใช้ในการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรัง

วิธีการป้อนสารให้สัตว์ทดลอง

นำกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร มาต่อด้วยเข็มป้อนสัตว์ทดลอง (Feeding tube) เบอร์ 18

ยาว 1.5 นิ้ว จากนั้นดูดสมุนไพรมีอยู่ในรูปของ Stock solution โดยให้ปริมาณสมุนไพรมานำหนักตัว โดยกำหนดปริมาณที่ป้อนประมาณ 0.2-0.4 มิลลิลิตร ตามข้อกำหนดของ Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) ส่วนหนูในกลุ่มควบคุมป้อนด้วยน้ำกลั่นในปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาและนิ้วหัวแม่มือข้างซ้ายดึงส่วนหนังบริเวณด้านต้นคอด้านบนของหนู ใช้อุ้งมือและนิ้วทั้งสามที่เหลือจับหนังตรงบริเวณหลังของหนูให้แน่น การจับโดยวิธีนี้ทำให้หนูไม่ตื่นและอ้าปากออกเล็กน้อย จึงสอด Feeding tube ผ่านบนลิ้นเข้าถึงลำคอแล้วค่อยสอดลงไปให้ลึกพอประมาณ ป้อนสารลงไปยังระมัดระวังและรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดแผลที่หลอดอาหารและไม่ทำให้หนูสำลัก โดยป้อนสารสมุนไพรมีในปริมาณให้สัตว์ทดลองในเวลาประมาณ 13.00 น. ทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง 3 เดือน

วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ทดลอง

การทำให้หนูสลบก่อนผ่าตัด นำหนูใส่ลงในกล่องเพื่อให้ดมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 5-10 วินาที จนกระทั่งสลบ นำออกมาและดึงคอเพื่อเคลื่อนกระดูกคอของหนู (Cervical dislocation) นำมาวางไว้ที่ถาดพาราฟินและจัดท่าหนูให้อยู่หงายตรงที่เท้าทั้งสองข้างด้วยเข็มหมุด

การผ่าตัดเจาะเลือดหัวใจ ใช้กรรไกรเปิดผ่านผิวหนังและเนื้อจากช่องท้อง ตัดกระดูกซี่โครงด้านหน้าทั้งสองข้างหน้าแล้วพลิกขึ้นไป จะเห็นหัวใจเด่นอยู่นอก ใช้เข็มปากเล็กจับบริเวณหัวใจส่วนปลายแหลมของหัวใจ (Apex part) โดยให้โดนกล้ามเนื้อหัวใจน้อยที่สุด แล้วดึงขึ้นมาเล็กน้อย จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 23 แหวงลงไปที่หัวใจห้องล่างซ้าย พร้อมกับเริ่มดูดเลือดอย่างช้าๆ ตามจังหวะการเต้นของหัวใจ จนได้ประมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและทางชีวเคมีคลินิกต่อไป

การเตรียมเลือดเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา นำเลือดของหนูปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่

ในหลอดทดลองที่มีสาร Ethylene diamine tetraacetate (EDTA) ขนาด 2 มิลลิกรัม บรรจุอยู่ และเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน และนำไปวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา คือค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด

การเตรียมซีรัมเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีของเลือด นำเลือดที่เจาะจากหัวใจปริมาณ 0.5-0.7 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองปิดปากให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่น้อยกว่า 15 นาที เลือดจะเริ่มแข็งตัว (Clot) บางส่วน นำตัวอย่างเลือดที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้ส่วนซีรัมแยกออกจากเม็ดเลือด ใช้ Micropipette ดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นซีรัมใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก (Microtube) เปล่าที่เตรียมไว้ และนำไปวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีคลินิก คือค่าการวิเคราะห์ AST, ALT, Billirun, ALP, Creatinine และ BUN รวมถึงตรวจวิเคราะห์ค่ากลูโคสและโคเรสเตอรอล

การเตรียมอวัยวะ เพื่อส่งวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ และวิเคราะห์ค่าน้ำหนักของอวัยวะที่ศึกษา หลังจากที่ได้เก็บเลือดจากหัวใจหนูแล้ว จึงเริ่มทำการผ่าตัดเพื่อชั่งน้ำหนักอวัยวะภายในด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกน้ำหนักของ หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม และกระเพาะอาหาร จากนั้นนำตับ ไต และม้ามใส่ในร้อยละ 10 สารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มมาลีน เพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาต่อไป

การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรมีในหลอดทดลองต่อการทำงานของตับและไต

โดยวัดระดับเอนไซม์ AST, ALT และ Bilirubin เพื่อบ่งบอกการทำงานของตับ และวัดระดับ BUN, ALP และ Creatinine เพื่อบ่งบอกการทำงานของไต ที่เปลี่ยนแปลงไปแต่ละกลุ่มเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการทดสอบโดยใช้หลักการ Colorimetry ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (MCC-3000 biochemistry machine) ณ ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ เซ็นทรัล แล็บ (Vet Central Lab)

การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรใบ กฤษณาต่อโครงสร้างการทำงานของตับ ไต และ ม้าม

เป็นการศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาค
ศาสตร์ของอวัยวะ โดยชำแหละอวัยวะและนำมาเข้า
ขบวนการตัดชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยาด้วย
กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาผลของสมุนไพรใบกฤษณาต่อ น้ำหนักตัว

การศึกษาผลของสมุนไพรใบกฤษณาต่อ
น้ำหนักตัวของหนู โดยการบันทึกน้ำหนักหนู หนึ่งวัน
ก่อนเริ่มการทดลอง และทุกๆ สัปดาห์ หลังจากเริ่ม
ให้สมุนไพรในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 3
เดือน โดยการชั่งน้ำหนักทุกครั้งจะทำในช่วงระยะ
เวลาที่ใกล้เคียงกันเป็นประจำ

การศึกษาผลของสมุนไพรใบกฤษณาต่อ น้ำหนักอวัยวะภายใน

การศึกษาผลของสมุนไพรใบกฤษณาต่อ
น้ำหนักเฉลี่ยสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในของหนู คือ
หัวใจ ตับ ไต ปอด ม้าม และกระเพาะอาหาร โดย
ชำแหละอวัยวะภายในแล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง
ทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้ววิเคราะห์เทียบกับกลุ่ม
ควบคุม

การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบทางสถิติใช้โปรแกรม
คอมพิวเตอร์ SPSS for window version 22.0
ข้อมูลแสดงในรูป Mean \pm Standard deviation
($\bar{X} \pm S.D.$) สัตว์ทดลองที่เสียชีวิตในระหว่างการ
ทดสอบไม่นำมารวมในการหาค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบ
ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Paired *t*-test
สำหรับน้ำหนัก และใช้ Independent *t*-test
สำหรับสารในเลือด และน้ำหนักอวัยวะ กำหนด
ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 เมื่อค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีนัย
สำคัญทางสถิติ สำหรับผลการตรวจสไลด์เนื้อเยื่อ
อวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาใช้ Fisher exact test ที่
ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

ผลการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังต่อการทำงานของ
ของตับ และไต โดยการวัดสารประกอบทางเคมี
ของเลือดในหนูที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณา

วิเคราะห์ผลต่อค่า ALT, AST และ Bilirubin
พบว่าทุกกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณาทั้งเพศผู้และ
เพศเมีย มีค่าเฉลี่ยของ ALT, AST และ Bilirubin
(Direct และ Total) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (ตารางที่
1 และ 2) ยกเว้นในหนูกลุ่มทดลองเพศผู้ที่ได้รับ
สมุนไพรขนาด 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่า มี
ค่าเฉลี่ยระดับ ALT ลดลงเท่ากับ 27.40 ± 10.85 U/L
จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ 39.44 ± 13.53 U/L อย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การที่มีค่าเอนไซม์
เหล่านี้ โดยเฉพาะค่า AST และ ALT ที่สูงขึ้นมากนั้น
เป็นตัวบ่งบอกว่า เซลล์ตับกำลังมีการอักเสบหรือแตก
สลายอยู่จึงทำให้เอนไซม์ตับซึ่งปกติจะอยู่แต่ภายใน
เซลล์ตับหลุดลอดออกมาในกระแสเลือดมากขึ้นทำให้
ตรวจพบได้ แต่การที่มีค่าลดลงไม่ได้เป็นตัวชี้บ่งถึง
การบาดเจ็บหรือการที่เซลล์ตับถูกทำลาย แต่อาจเกิด
ได้จากภาวะที่มีเลือดที่ผ่าน (Ischemia) ไปตบ่น้อย
ลง (Lab test online, 2013) นอกจากนี้แล้วจาก
การอ้างอิงจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (2554) ได้
รายงานผลอ้างอิงสำหรับค่าชีวเคมีของเลือดของหนู
เมาส์เมื่อโตเต็มวัย จะมีค่า ALT อยู่ประมาณ 13-39
U/L ในเพศผู้ และ 7-36 U/L ในเพศเมีย ซึ่งผลจาก
กลุ่มทดลองในโครงการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้
จากการศึกษาในกลุ่มทดสอบนั้น มีค่ายังอยู่ในระดับ
ปกติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิง

วิเคราะห์ผลต่อค่า BUN, Creatinine และ
ALP หลังจากให้สมุนไพรเป็นระยะเวลา 90 วัน
พบว่าทุกกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณาทั้งเพศผู้และ
เพศเมีย มีค่าเฉลี่ยของระดับ BUN และ Creatinine
ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ
กลุ่มควบคุม ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ 2) ยกเว้น
ในกลุ่มเพศผู้ที่ได้รับสมุนไพรในขนาด 0.05 กรัม/
กิโลกรัม/วัน พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ BUN ลดลง เท่ากับ

18.20±5.13 mg/dl จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 23.77±5.95 mg/dl และกลุ่มเพศเมียที่ได้รับสมุนไพรในขนาด 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ Creatinine เพิ่มขึ้น เท่ากับ 0.90±0.15 mg/dl จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.73±0.05 mg/dl อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า ALP ในกลุ่มเพศเมียที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณา ขนาด 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่ามีค่าเฉลี่ยระดับ ALP หลังจากสิ้นสุดการทดลองมีค่าลดลง เท่ากับ 65.00±9.77 U/L จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 84.77±6.92 U/L กลุ่มที่ได้รับสมุนไพรขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน เพศผู้มีค่าเฉลี่ย ALP เพิ่มขึ้น เท่ากับ 83.85±19.57 U/L จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 53.55±9.20 U/L ในขณะที่เพศเมียมีค่าลดลง เท่ากับ 62.90±29.04 U/L จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 84.77±6.92 U/L และกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรขนาด 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน เพศเมียมีค่า ALP ลดลง เท่ากับ 54.77±26.30 U/L จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ 84.77±6.92 U/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากโดยการอ้างอิงจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (2554) ได้รายงานผลอ้างอิงสำหรับค่าชีวเคมีของเลือดของหนูเมาส์เมื่อโตเต็มวัย จะมีค่า BUN ประมาณ 14.4-27.2 mg/dl และ 12.0-34.3 mg/dl ในเพศผู้และเพศเมีย ตามลำดับ ค่า Creatinine ประมาณ 0.28-0.40 mg/dl และ 0.12-0.45 mg/dl ในเพศผู้และเพศเมีย ตามลำดับ ค่า ALP ประมาณ 40-88 U/L ในเพศผู้ และ 54-121 U/L ในเพศเมีย ซึ่งผลจากกลุ่มทดสอบในโครงการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการศึกษาในกลุ่ม

ทดสอบนั้น มีค่ายังอยู่ในพิสัยปกติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิง

ผลต่อค่ากลูโคสและโคเรสเตอรอล หลังจากครบกำหนดระยะเวลา 90 วัน พบว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณาทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสและโคเรสเตอรอล ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ 2) ยกเว้นในกลุ่มทดลองเพศเมียที่ได้รับสมุนไพรขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่ามีค่าเฉลี่ยโคเรสเตอรอลในเลือดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 93.20±19.12 mg/dl จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 73.44±19.35 mg/dl อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการอ้างอิงจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (2554) ได้รายงานผลอ้างอิงสำหรับค่าชีวเคมีของเลือดของหนูเมาส์โตเต็มวัยจะมีค่ากลูโคส อยู่ประมาณ 65.4-161.3 mg/dl และ 69.8-153.3 mg/dl ในเพศผู้และเพศเมีย ตามลำดับ ส่วนค่าโคเรสเตอรอล ประมาณ 80-143 mg/dl และ 66-134 mg/dl ในเพศผู้และเพศเมีย ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลอง สรุปได้ว่า ค่าจากกลุ่มทดลองเพศเมียที่ได้รับสมุนไพรขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน ถึงแม้ว่าจะมีแนวโน้มของค่าโคเรสเตอรอลที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เนื่องจากค่าที่เพิ่มขึ้นนั้นเมื่อเทียบกับค่าอ้างอิงแล้วพบว่ายังอยู่ในพิสัยปกติ และเนื่องจากค่าที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นั้นไม่พบในค่าที่ความเข้มข้นของสมุนไพรที่มากที่สุด ซึ่งอาจจะสามารถสรุปได้ว่า สมุนไพรใบกฤษณาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าโคเรสเตอรอลในการทดสอบนี้

ตารางที่ 1 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูเพศผู้ (X±S.D.) ระหว่างหนูกลุ่มควบคุม กับหนูได้รับสมุนไพร ไบโกลชันนา ขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 90 วัน

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม N=9	ขนาดของสมุนไพรไบโกลชันนา (กรัม/กิโลกรัม/วัน)		
		0.05 N=10	0.1 N=7	0.2 N=7
ALT (U/L)	39.44±13.53	27.40±10.85*	28.42±28.42	34.71±24.97
AST (U/L)	166.66±121.49	165.30±219.38	98.85±31.80	200.85±143.12
Creatinine (mg/dl)	0.70±.15	0.73±.08	1.62±2.36	0.72±.04
BUN (mg/dl)	23.77±5.95	18.20±5.13*	22.14±3.48	19.85±5.45
ALP (U/L)	53.55±9.20	60.60±20.21	83.85±19.57*	60.29±20.33
Direct Bilirubin (mg/dl)	0.30±0.12	0.43±0.42	0.26±0.04	0.51±0.58
Total Bilirubin (mg/dl)	0.24±0.12	0.28±0.17	0.20±0.06	0.24±0.18
Glucose (mg/dl)	107.77±46.42	103.20±25.63	113.57±36.75	136.28±43.57
Cholesterol (mg/dl)	120.88±18.44	130.20±13.44	133.00±20.46	100.71±26.75

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูเพศเมีย (X±S.D.) ระหว่างหนูกลุ่มควบคุม กับหนูได้รับสมุนไพร ไบโกลชันนา ขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 90 วัน

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม N=9	ขนาดของสมุนไพรไบโกลชันนา (กรัม/กิโลกรัม/วัน)		
		0.05 N=10	0.1 N=10	0.2 N=9
ALT (U/L)	36.55±16.50	48.50±31.31	53.10±43.52	73.11±70.78
AST (U/L)	159.44±143.48	239.10±241.71	167.50±123.53	343.22±283.06
Creatinine (mg/dl)	0.73±0.05	0.74±.06	2.22±3.08	0.90±0.15*
BUN (mg/dl)	21.77±4.73	23.10±4.17	23.80±7.45	19.78±8.42
ALP (U/L)	84.77±6.92	65.00±9.77*	62.90±29.04*	54.77±26.30*
Direct Bilirubin (mg/dl)	0.42±0.45	0.39±0.41	0.54±0.71	0.80±0.65
Total Bilirubin (mg/dl)	0.23±0.14	0.23±0.16	1.84±4.98	0.33±0.20
Glucose (mg/dl)	130.66±71.92	142.50±60.52	118.70±49.55	128.11±69.98
Cholesterol (mg/dl)	73.44±19.35	88.80±15.44	93.20±19.12*	82.78±14.85

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าโลหิตวิทยาของหนูที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ

ผลต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง จากการศึกษานูหนูทุกกลุ่มได้ป้อนสมุนไพรมะเขือเทศ เป็นระยะเวลา 90 วัน ผลการทดลอง พบว่า ในหนูเพศผู้ทุกกลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน เพศผู้มีปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเท่ากับ $7.38 \pm 0.53 \times 10^6$ cell/mm³ กลุ่มที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเท่ากับ $7.97 \pm 0.99 \times 10^6$ cell/mm³ และกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น เท่ากับ $7.73 \pm 0.57 \times 10^6$ cell/mm³ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $6.65 \pm 0.29 \times 10^6$ cell/mm³ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในหนูเพศเมีย พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ในกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน เท่ากับ $8.59 \pm 0.62 \times 10^6$ cell/mm³ และกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน เท่ากับ $8.06 \pm 0.86 \times 10^6$ cell/mm³ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $7.06 \pm 0.46 \times 10^6$ cell/mm³ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน ตารางที่ 3 และ 4 ทั้งนี้ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (2554) ได้รายงานผลอ้างอิงสำหรับค่าโลหิตวิทยาของหนู Mouse ICR เมื่อโตเต็มวัยว่าจะมีปริมาณของเม็ดเลือดแดงอยู่ที่ $7.4-9.2 \times 10^6$ cells/mm³ และ $4.1-9.4 \times 10^6$ cells/mm³ ในเพศผู้และในเพศเมีย ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งเพศผู้และเพศเมียจากผลการทดลองยังอยู่ในช่วงพิสัยปกติตามมาตรฐานที่กำหนด ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารที่อยู่ในสมุนไพรมะเขือเทศนั้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดแดง

ผลต่อปริมาณความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน เมื่อนำเลือดของหนูที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศในขนาดที่แตกต่างกันที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ ทุกวันจนครบกำหนดการทดลอง (ตารางที่ 3 และ 4) พบว่า หนูใน

กลุ่มเพศผู้ มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน เท่ากับ 13.51 ± 1.00 g/dl และกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้น เท่ากับ 13.92 ± 0.76 g/dl จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 12.41 ± 0.47 g/dl อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในหนูเพศเมียพบว่า มีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้น ในกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน เท่ากับ 13.54 ± 0.88 g/dl จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 12.45 ± 0.74 g/dl อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลอ้างอิงของทางศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (2554) ได้รายงานผลอ้างอิงสำหรับค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินของหนู Mouse ICR เมื่อโตเต็มวัย จะมีค่าประมาณ 12.2-14.8 g/dl ในเพศผู้ และ 9.7-16.9 g/dl ในเพศเมีย ซึ่งจากการทดลองอาจสามารถสรุปได้ว่า ค่าจากกลุ่มทดสอบถึงแม้ว่าจะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อเทียบกับค่าอ้างอิงแล้วยังอยู่ในพิสัยปกติ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า สมุนไพรมะเขือเทศไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าฮีโมโกลบิน

ผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จากการศึกษานูหนูทุกกลุ่มได้ป้อนสมุนไพรมะเขือเทศ เป็นระยะเวลา 90 วัน ตามลำดับ พบว่าหนูทุกๆ กลุ่ม มีค่าเฉลี่ยของปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3 และ 4) ยกเว้น หนูในกลุ่มเพศผู้ที่ได้รับสมุนไพรมะเขือเทศ 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพิ่มขึ้น เท่ากับ $40.33 \pm 2.06\%$ จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ $35.44 \pm 2.47\%$ และหนูในกลุ่มเพศเมีย มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพิ่มขึ้น เท่ากับ $39.90 \pm 3.07\%$ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $36.00 \pm 2.56\%$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (2554) ที่ได้รายงานผลอ้างอิงสำหรับค่าโลหิตวิทยาของหนู Mouse ICR เมื่อโตเต็มวัย จะมีค่าของปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นอยู่

ประมาณ 34.0-42.9 % และ 35.2-47.7 % ในเพศผู้ และเพศเมีย ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารที่อยู่ในสมุนไพรใบกฤษณานั้น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ

ผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณาในขนาดที่แตกต่างกัน 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ยกเว้นหนูเพศผู้ที่ได้รับสมุนไพรขนาด 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย (ตารางที่ 3 และ 4) นอกจากนี้แล้วยังสอดคล้องกับศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (2554) ที่ได้รายงานผลอ้างอิงปริมาณเม็ดเลือดขาวของหนู Mouse ICR เมื่อโตเต็มวัย จะมีค่าของปริมาณเม็ดเลือดขาวอยู่ประมาณ $1.3-5.2 \times 10^3$ cells/mm³ และ $1.0-5.7 \times 10^3$ cells/mm³ ในหนูเพศผู้และเพศเมีย ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารในสมุนไพรใบกฤษณาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวมากนัก

ผลต่อปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด นิวโทรฟิล อีโอซิโนฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ ของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณาในขนาดที่แตกต่างกันที่ 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3 และ 4) พบว่า ในหนูเพศผู้ที่ขนาดของสมุนไพร 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีค่าเฉลี่ยของอีโอซิโนฟิลเพิ่มขึ้น เท่ากับ $1.78 \pm 0.83\%$ จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ $0.75 \pm 0.70\%$ และค่าเฉลี่ยโมโนไซต์เพิ่มขึ้น เท่ากับ $2.44 \pm 0.72\%$ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $1.50 \pm 1.07\%$ ที่ความเข้มข้นของสมุนไพรขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีค่าเฉลี่ยของนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้น เท่ากับ $65.67 \pm 3.88\%$ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $57.63 \pm 4.24\%$ และค่าเฉลี่ยอีโอซิโนฟิล เพิ่มขึ้นเท่ากับ $2.33 \pm 1.21\%$ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $0.75 \pm 0.70\%$ และที่ความเข้มข้นของสมุนไพรขนาด 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีค่าเฉลี่ยของ

ค่าเฉลี่ยอีโอซิโนฟิลเพิ่มขึ้น เท่ากับ $3.17 \pm 0.75\%$ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $0.75 \pm 0.70\%$ และค่าเฉลี่ยของลิมโฟไซต์ ลดลงเท่ากับ $29.83 \pm 5.56\%$ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $39.25 \pm 5.39\%$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ในหนูทดลองเพศเมีย ที่ขนาดของสมุนไพร 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีค่าเฉลี่ยของนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้นเท่ากับ $67.80 \pm 7.51\%$ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $55.63 \pm 7.13\%$ และมีค่าเฉลี่ยของลิมโฟไซต์ ลดลงเท่ากับ $28.10 \pm 5.15\%$ จากกลุ่มควบคุมเท่ากับ $37.00 \pm 4.89\%$ และที่ขนาดสมุนไพรที่ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่า มีค่าเฉลี่ยของนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้นเท่ากับ $64.43 \pm 4.43\%$ จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ $55.63 \pm 7.13\%$ และค่าเฉลี่ยของลิมโฟไซต์ ลดลงเท่ากับ $30.29 \pm 3.04\%$ จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ $37.00 \pm 4.89\%$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (2554) ได้รายงานผลอ้างอิงสำหรับค่าโลหิตวิทยาของหนู Mouse ICR เมื่อโตเต็มวัยว่าจะมีปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ คือ นิวโทรฟิล อีโอซิโนฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ เท่ากับ 19.6-62.0, 0-6.0, 36.0-89.0 และ 0-1.0 ตามลำดับ ในเพศผู้ และ 13.0-60.0, 0-5.0, 38.0-85.0 และ 0-4.0 ตามลำดับ ในเพศเมีย ซึ่งจากการทดลองเป็นไปได้ว่าสารที่อยู่ในสมุนไพรใบกฤษณานั้นส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงแบบไม่แน่นอนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและค่ามาตรฐานจากศูนย์สัตว์ทดลอง

ผลต่อค่าดัชนีทางโลหิต เมื่อนำเลือดของหนูที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณา ที่ได้รับการป้อนในขนาดที่แตกต่างกัน 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ ทุกวันจนครบกำหนดการทดลอง ผลการศึกษา ค่าเฉลี่ยปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดงหนึ่งเซลล์ (MCV) ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรีโมโกลบินต่อเม็ดเลือดแดงหนึ่งเซลล์ (MCH) และค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (MCHC) ดังตารางที่ 3 และ 4 พบว่า ในหนูทดลองเพศผู้ ที่สมุนไพรขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2

กรัม/กิโลกรัม/วัน MCV มีค่าลดลง เท่ากับ 51.88 ± 1.36 fl, 48.00 ± 1.41 fl และ 46.00 ± 1.26 fl ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เท่ากับ 54.12 ± 0.99 fl และที่ 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ค่า MCH ลดลง เท่ากับ 16.38 ± 0.44 pg/red cell และ 15.87 ± 0.39 pg/red cell เมื่อเทียบจากกลุ่มควบคุม ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่หนูทดลองเพศเมีย ที่สมุนไพโรไบ กฤษณขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่า มีค่าเฉลี่ย MCV ลดลง เท่ากับ 49.44 ± 1.59 fl, 46.80 ± 1.31 fl และ 46.00 ± 1.53 fl ตามลำดับ เมื่อเทียบจากกลุ่มควบคุม และมีค่าเฉลี่ยของ MCH ลดลง เท่ากับ 16.68 ± 0.80 pg/red cell, 15.63 ± 0.89 pg/red cell และ 16.00 ± 1.18 pg/red cell ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และที่ขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีค่าเฉลี่ย MCHC ลดลงเท่ากับ 33.54 ± 1.28 g/dl RBC จากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 34.36 ± 0.78 g/dl RBC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยผลอ้างอิงของทางศูนย์สัตว์ทดลอง

แห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (2554) ได้รายงานผลอ้างอิงสำหรับค่า MCV ประมาณ 42.3-49.5 fl ในเพศผู้ และ 46.6-52.4 fl ในเพศเมีย ค่า MCH เท่ากับ 14.7-17.5 pg/red cell ในเพศผู้ และ 16.6-23.7 pg/red cell ในเพศเมีย และค่า MCHC จะมีค่าประมาณ 32.6-36.6 g/dl RBC ในเพศผู้ และ 34.7-50.3 g/dl RBC ในเพศเมีย ตามลำดับ ค่าดัชนีของเลือดนี้ต้องอาศัยค่าของ RBC, Hematocrit และ Hemoglobin มาพิจารณาร่วมกัน แล้วจึงนำมาพิจารณาว่าเป็นโรคโลหิตจางชนิดใด (อานนท์ บุญยะรัตเวช, 2535) ซึ่งผลจากการทดลองในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า เป็นไปได้ว่าสารที่อยู่ในสมุนไพโรไบ กฤษณานั้นส่งผลให้ค่า MCV ในหนูทดลองเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสมุนไพโรไบขนาด 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และค่า MCV, MCH และ MCHC ในหนูเพศเมียกลุ่มทดลองมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและค่ามาตรฐานจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

ตารางที่ 3 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศผู้ (X±S.D.) ระหว่างหนูกลุ่มควบคุม กับหนูที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณา ขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 90 วัน

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม N=8	ขนาดของสมุนไพรใบกฤษณา (กรัม/กิโลกรัม/วัน)		
		0.05 N=10	0.1 N=7	0.2 N=8
RBC ($\times 10^6$ cells/mm ³)	6.65 ± 0.29	7.38 ± 0.53*	7.97 ± 0.99*	7.73 ± 0.57*
Hemoglobin (g/dl)	12.41 ± 0.47	13.51 ± 1.00*	13.92 ± 0.76*	12.32 ± 0.96
Hematocrit (%)	35.44 ± 2.47	38.22 ± 3.03	40.33 ± 2.07*	35.33 ± 2.88
WBC ($\times 10^3$ cells/mm ³)	4.85 ± 2.70	5.98 ± 2.70	6.65 ± 9.43	7.36 ± 2.61
Neutrophils (%)	57.63 ± 4.24	57.56 ± 5.79	65.67 ± 3.88*	65.17 ± 5.78
Eosinophils (%)	0.75 ± 0.70	1.78 ± 0.83*	2.33 ± 1.21*	3.17 ± 0.75*
Lymphocytes (%)	39.25 ± 5.39	38.22 ± 6.43	32.33 ± 6.44	29.83 ± 5.56*
Monocytes (%)	1.50 ± 1.07	2.44 ± 0.72*	1.83 ± 0.75	1.83 ± 0.41
MCV (fl)	54.12 ± 0.99	51.88 ± 1.36*	48.00 ± 1.41*	46.00 ± 1.26*
MCH (pg/red cell)	18.53 ± 0.66	18.26 ± 0.94	16.38 ± 0.44*	15.87 ± 0.39*
MCHC (g/dl RBC)	34.30 ± 1.59	35.03 ± 1.16	34.10 ± 0.79	34.40 ± 1.34
Platelets ($\times 10^3$ cells/mm ³)	787.62 ± 308.19	817.88 ± 123.5	906 ± 35.45	774.00 ± 298.

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศเมีย (X±S.D.) ระหว่างหนูกลุ่มควบคุม กับหนูที่ได้รับสมุนไพรใบฤๅษณา ขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 90 วัน

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม N=8	ขนาดของสมุนไพรใบฤๅษณา (กรัม/กิโลกรัม/วัน)		
		0.05 N=10	0.1 N=10	0.2 N=9
RBC ($\times 10^6$ cells/mm ³)	7.06±0.46	7.52±0.82	8.59±0.62*	8.06±0.86*
Hemoglobin (g/dl)	12.45±0.74	12.54±0.88	13.54±0.88*	12.93±1.13
Hematocrit (%)	36.00±2.56	36.89±3.10	39.90±3.07*	36.71±3.82
WBC ($\times 10^3$ cells/mm ³)	4.66±1.51	4.38±1.04	6.02±2.21	5.88±1.21
Neutrophils (%)	55.63±7.13	60.33±8.76	67.80±7.51*	64.43±4.43*
Eosinophils (%)	2.38±0.51	2.11±1.27	3.20±1.40	3.00±1.15
Lymphocytes (%)	37.00±4.89	35.78±8.93	28.10±5.15*	30.29±3.04*
Monocytes (%)	2.13±0.99	1.78±0.67	1.80±0.63	2.29±1.11
MCV (fl)	51.25±1.66	49.44±1.59*	46.80±1.31*	46.00±1.53*
MCH (pg/red cell)	17.54±0.51	16.68±0.80*	15.63±0.89*	16.00±1.18*
MCHC (g/dl RBC)	34.36±0.78	33.62±1.32	33.54±1.28*	34.73±1.73
Platelets ($\times 10^3$ cells/mm ³)	786.75±243.5	760.66±253.3	835.10±127.2	820.14±80.2
	8	6	2	6

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ผลต่อทางจุลกายวิภาคของหนูเมาส์ที่ได้รับสมุนไพรใบฤๅษณา

ผลต่อไต หลังจากให้สมุนไพรขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นขนาดเทียบเท่า มากกว่าหนึ่งเท่า (1x) และสองเท่า (2x) ของการบริโภคในคน ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 90 วัน ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ผลการตรวจทางจุลกายวิภาคของไต มีการพบ Focal hemorrhage และ Lymphocytic interstitial nephritis แต่เป็นการพบทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง และไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5 และตารางที่ 6)

ผลต่อตับ หลังจากให้สมุนไพรขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นขนาดเทียบเท่า มากกว่าหนึ่งเท่า (1x) และสองเท่า (2x) ของการ

บริโภคในคน ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 90 วัน ทั้งเพศผู้และเพศเมียพบว่า ผลการตรวจทางจุลกายวิภาคของตับ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่มีการพบ Hydropic degeneration หรือลักษณะการเสื่อมของเซลล์เนื่องจากเซลล์สะสมน้ำไว้ภายในไซโทพลาสซึมทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองและไม่พบ Focal lymphocytic portal hepatic แต่ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เห็นไม่มีความสำคัญทางพยาธิวิทยา (ตารางที่ 5 และตารางที่ 6)

ผลต่อม้าม หลังจากให้สมุนไพรขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นระยะเวลา 90 วัน ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ผลการตรวจทางจุลกายวิภาคของม้าม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่มีการพบการเพิ่ม

จำนวนของเซลล์ (Megakaryocytosis) เนื่องจากมีการกระตุ้นให้เซลล์มีการทำงานมากขึ้น หรือเป็นการตอบสนองต่อภัยอันตรายที่กระทำต่อเซลล์ที่โตเต็มที่ (Lymphoid hyperplasia) ทั้งในกลุ่มควบคุมและ

กลุ่มทดลอง แต่ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เห็นไม่มีความสำคัญทางพยาธิวิทยา (ตารางที่ 5 และตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในหนูเพศผู้ระหว่างหนูกลุ่มควบคุม กับหนูได้รับสมุนไพรใบฤๅษณา ขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 90 วัน

Organs and Microscopic findings	กลุ่มควบคุม N=9	ขนาดของสมุนไพรฤๅษณาที่ให้ในสัตว์ทดลอง (กรัม/กิโลกรัม/วัน)		
		0.05 N=10	0.1 N=7	0.2 N=8
Kidney				
No significant lesion	2/9 (22.2%)	1/10 (10%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)
Focal Hemorrhage	1/9 (11.1%)	0/10 (0%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)
Mild multifocal lymphocytic interstitial nephritis	6/9 (66.6%)	8/10 (80%)	6/7 (85.7%)	6/8 (75.0%)
Moderate multifocal lymphocytic interstitial nephritis	0/9 (0%)	1/10 (10%)	1/7 (14.2%)	2/8 (25.0%)
Liver				
No significant lesion	4/9 (44.4%)	5/10 (50%)	1/7 (14.2%)	7/8 (87.5%)
Mild Hydropic degeneration	5/9 (55.5%)	4/10 (40%)	3/7 (42.8%)	1/8 (12.5%)
Moderate Hydropic degeneration	0/9 (0%)	1/10 (10%)	3/7 (42.8%)	0/8 (0%)
Focal Lymphocytic portal hepatitis	0/9 (0%)	0/10 (0%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)
Spleen				
No significant lesion	5/9 (55.5%)	1/10 (10%)	0/7 (0%)	1/8 (12.5%)
Megakaryocytosis	5/9 (55.5%)	4/10 (40%)	2/7 (28.5%)	1/8 (12.5%)
Mild lymphoid hyperplasia	3/9 (33.3%)	2/10 (20%)	4/7 (57.1%)	1/8 (12.5%)
Moderate lymphoid hyperplasia	2/9 (22.2%)	1/10 (10%)	1/7 (14.2%)	0/8 (0%)

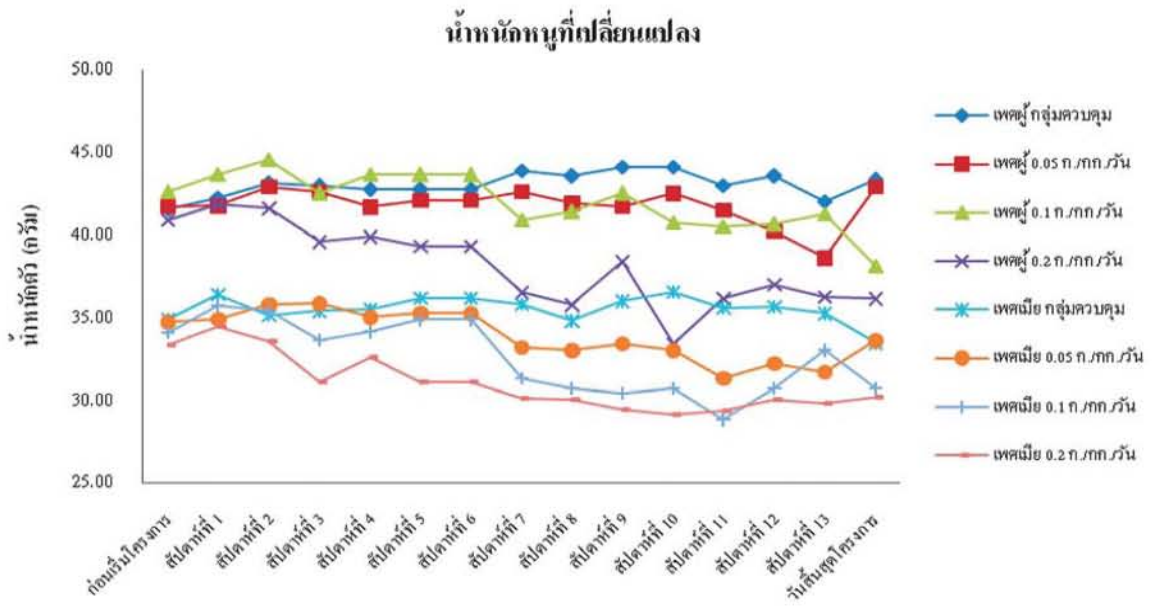
ตารางที่ 6 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในหนูเพศเมียระหว่างหนูกลุ่มควบคุม กับหนูที่ได้รับสมุนไพรรักษา ไบโกลูชัน ขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 90 วัน

Organs and Microscopic findings	กลุ่มควบคุม N=8	ขนาดของสมุนไพรรักษาที่ให้ในสัตว์ทดลอง (กรัม/กิโลกรัม/วัน)		
		0.05 N=10	0.1 N=10	0.2 N=9
Kidney				
No significant lesion	1/9 (11.1%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)	0/9 (0%)
Focal Hemorrhage	0/9 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/9 (0%)
Mild multifocal lymphocytic interstitial nephritis	8/9 (88.8%)	7/10 (70%)	8/10 (80%)	7/9 (77.7%)
Moderate multifocal lymphocytic interstitial nephritis	1/9 (11.1%)	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/9 (22.2%)
Liver				
No significant lesion	1/9 (11.1%)	1/10 (10%)	3/10 (30%)	1/9 (11.1%)
Mild Hydropic degeneration	8/9 (88.8%)	7/10 (70%)	6/10 (60%)	7/9 (77.7%)
Moderate Hydropic degeneration	0/9 (0%)	2/10 (20%)	0/10 (0%)	1/9 (11.1%)
Focal Lymphocytic portal hepatitis	0/9 (0%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	0/9 (0%)
Spleen				
No significant lesion	3/9 (33.3%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	0/9 (0%)
Megakaryocytosis	2/9 (22.2%)	1/10 (10%)	4/10 (40%)	3/9 (33.3%)
Mild lymphoid hyperplasia	5/9 (55.5%)	5/10 (50%)	4/10 (40%)	5/9 (55.5%)
Moderate lymphoid hyperplasia	1/9 (11.1%)	4/10 (40%)	1/10 (10%)	0/9 (0%)

ผลต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อสัปดาห์

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มหนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสมุนไพรรักษาขนาดมีน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่มีการลดลงเล็กน้อยของน้ำหนักตัวของหนูเพศผู้ในกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรรักษาขนาด 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ที่สัปดาห์ที่ 10 และหนูเพศเมียในกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรรักษาขนาด 0.1 กรัม/

กิโลกรัม/วัน ในสัปดาห์ที่ 11 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเป็นผลมาจากสภาวะแวดล้อม สิ่งแวดล้อม ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการบริโภคอาหารในสัปดาห์ดังกล่าวอย่างเฉพาะเจาะจง เพราะเมื่อสัปดาห์ต่อมาน้ำหนักเฉลี่ยของกลุ่มดังกล่าวก็กลับมาอยู่ในภาวะปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 4

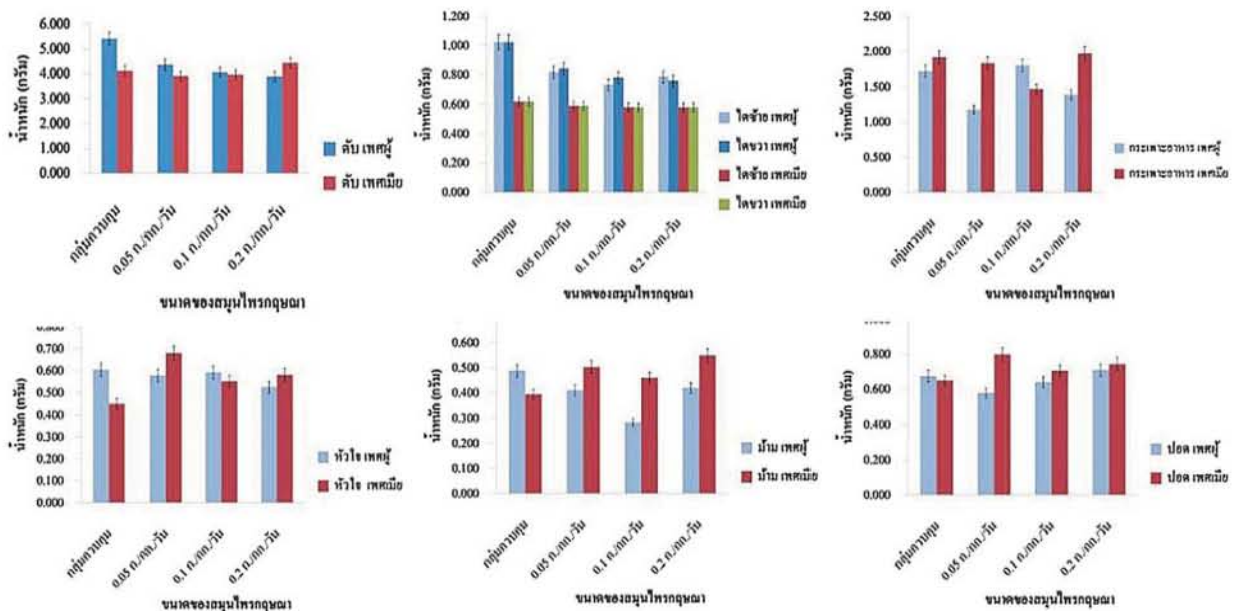


ภาพที่ 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนู (กรัม) เพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสมุนไพรกฤษณาตลอดระยะเวลา 90 วัน

ผลต่อน้ำหนักของอวัยวะภายใน

การเปรียบเทียบน้ำหนักของอวัยวะสัมพันธ์ ตับ ไต (ชายและขวา) กระเพาะอาหาร หัวใจ ม้าม และปอด ของหนูเพศผู้และหนูเพศเมีย ระหว่างหนู กลุ่มควบคุมกับหนูที่ได้รับสมุนไพรใบกฤษณา ขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ

นาน 90 วัน ทั้งเพศผู้และเพศเมีย แสดงตามตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยสัมพันธ์ของอวัยวะภายในที่ศึกษาไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 2 น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์หนูที่ได้รับสมุนไพรกฤษณาตลอดระยะเวลา 90 วัน

บทสรุป

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรใบกฤษณาเมื่อบริโภคในขนาดที่เทียบเท่ากับการบริโภคในคน และที่มากกว่า 2 และ 4 เท่า กรัมต่อน้ำหนักตัวกิโลกรัม ตามลำดับ โดยใช้หนูเม็สสายพันธุ์ ICR ทั้งเพศผู้และเพศเมีย จำนวน 80 ตัว (เพศผู้ 40 ตัว เพศเมีย 40 ตัว) โดยแบ่งหนูแบบสุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ป้อนด้วยน้ำกลั่น กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มทดลองป้อนด้วยสมุนไพรใบกฤษณาขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัมต่อน้ำหนักตัวกิโลกรัม เป็นเวลา 3 เดือน

ผลการศึกษาพบว่า สมุนไพรใบกฤษณา ไม่เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไป และไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวตลอดระยะเวลาการทดลอง ส่วนน้ำหนักเฉลี่ยสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในที่ศึกษาไม่แตกต่างกันทางสถิติจากกลุ่มควบคุม สำหรับผลทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน (ไต ตับ และม้าม) พบลักษณะ Focal hemorrhage และ Lymphocytic interstitial nephritis ในไต พบลักษณะการเสื่อมของเซลล์เนื่องจากเซลล์สะสมน้ำไว้ในภายในไซโทพลาสซึม (Hydropic degeneration) แต่ไม่พบ Focal lymphocytic portal hepatic ในตับ ส่วนในม้าม พบลักษณะการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Megakaryocytosis) เนื่องจากมีการกระตุ้นให้เซลล์มีการทำงานเพิ่มขึ้น และยังพบ Lymphoid hyperplasia แต่ทั้งหมดนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่มีความสำคัญทางพยาธิวิทยา ค่าเคมีคลินิกของเลือด ในหนูเพศผู้กลุ่มทดลอง พบว่าเมื่อป้อนสมุนไพรขนาด 0.05 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทำให้ค่า Alanine transaminase และ Blood urea nitrogen ลดลง แต่เมื่อป้อนด้วยสมุนไพรขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทำให้ค่า Alkaline phosphatase เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้าม หนูเพศเมียกลุ่มทดลอง พบว่า เมื่อป้อนสมุนไพรขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทำให้ค่า Cholesterol เพิ่มขึ้น และเมื่อป้อนสมุนไพรขนาด 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทำให้ค่า

Creatinine เพิ่มขึ้นด้วย ในขณะที่ค่า Alkaline phosphatase ลดลงทุกกลุ่มทดลอง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับค่าอ้างอิง พบว่ายังอยู่ในช่วงวิสัยปกติ ส่วนค่าเลือดทางโลหิตวิทยา พบว่า ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดง ในทุกกลุ่มทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากผลจากการศึกษาสรุปได้ว่า การบริโภคสมุนไพรใบกฤษณาความเข้มข้นขนาด 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน ไม่พบพิษกึ่งเรื้อรังที่แตกต่างอย่างชัดเจนจากกลุ่มควบคุม เมื่อรับประทานซ้ำๆ เป็นเวลานานถึง 90 วัน อย่างไรก็ตามประชาชนที่นำมาใช้รับประทานในปัจจุบัน นิยมรับประทานต่อเนื่องเป็นเวลานานมากกว่าที่ได้ทำการศึกษา ดังนั้นหากจะทำให้เกิดความมั่นใจในความปลอดภัยของการใช้สมุนไพรนี้ ควรต้องศึกษาแบบพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity) ต่อไป ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสามารถนำเอาความรู้และผลของการศึกษาครั้งนี้ไปใช้ในการคำนวณขนาดของสมุนไพรเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาแพทย์ทางเลือก. (2551). (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ร้านจุฬาเจริญทรัพย์.
- คณะกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ. (2555). *บัญชียาหลัก*. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ ปัญญา เต็มเจริญ. (2539). *หลักการทางพิษวิทยา*. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (national Laboratory Animal Center, Mahidol University). (2554). จาก http://www.nlac.mahidol.ac.th/nlacth/index.php?option=com_content&view=article&id=139%3A201

- 3-07-02-15-3503&catid=64&Itemid=203.
- สุชาติดา มานอก และคณะ. (2553). การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเบาหวานของใบกฤษณาและสารสำคัญออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบกฤษณา. รายงานทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.
- อานนท์ บุญยรัตเวช. (2535). โลหิตวิทยาเม็ดเลือดแดง. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดฟีนีฟับลิชชิง.
- อัจฉรา แก้วน้อย และคณะ. (2552). การศึกษาพิษจุนัขสามุนไพรรอบกฤษณาต้านเบาหวาน. รายงานทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.
- Ballantyne, B., Marrs, T., & Syversen, T. (2000). **General and applied toxicology : Repeated exposure toxicity.** (2nd ed). New York: Churchill living stone.
- Institutional Animal Care and Use Committee. (2010). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.** (8th ed). Washington, D.C.
- Lab test online. (2013). American Association for Clinical Chemistry.
- Organization for Economic Cooperation and Development. (1999). Repeat Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents, Test Guideline No. 408, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.