วว.

โครงการวิจัยที่ ภ.50-06/ย.4/รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันสำหรับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 50-06
วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดปรับสมดุลร่างกาย (Adaptogens)

โครงการย่อยที่ 4
วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันสำหรับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกัน สำหรับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

โดย

ฉันทรา พูนศิริ

ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา **อมรรัตน์ ขยันการนาวี**
เตือนตา เสมาทอง **วิภาพร พัฒน์เวช**
ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูล **สรียา เรืองพัฒนพงศ์**
ภัทรา อะหมะดี พีรชะหีด **กฤติยา ทิสยากร**
ประไพภัทร คลังทรัพย์ **รัตนศิริ จิวานนท์**
อรรคชัย ตันตราวงศ์ **สิน ตั้งสถิรภักดี**
ไสว นาคาแก้ว **วิเชียร เขยนอก**
ธนา ศรีสม **เสาวลักษณ์ เรืองศรี**
วาสนา ชังอินทร์ **เพ็ญใจ เสมาทอง**
กนกกาญจน์ ชิตเจริญ **ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล**

บรรณาธิการ วว., ปทุมธานี 2556
ลิขิต หาญจางสิทธิ์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
สลิลดา พัฒนศิริ

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นายยงวุฒิ เสาวพฤกษ์)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันสำหรับผู้ป่วยเอดส์ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จะช่วยให้ผู้ป่วยเอดส์ หรือผู้ได้รับเชื้อ HIV มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น สามารถต่อสู้กับโรคแทรกซ้อนได้ดีขึ้น ดิฉันกราบขอบพระคุณผู้บริหาร วว. ที่เห็นความสำคัญของโครงการและอนุมัติงบประมาณสนับสนุนมาโดยตลอด ขอขอบคุณ คุณกอบโชค พ่วงพี แห่งเปล้าแดงโอสถ ที่อนุเคราะห์วัตถุดิบพืชเปล้าตะวันเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณ ดร. วัชรี ลิมปนสิทธิกุล แห่งภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความร่วมมือวิจัยด้านเภสัชวิทยาในหลอดทดลอง ขอขอบคุณ ศ.น.สพ. ดร. วิทยา ธรรมวิทย์ และ รศ. ลักขณา หิมะคุณ แห่งภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ ขอขอบคุณนายแพทย์อเนก อยู่สบาย และคุณเรียมศิริ สุโนภักดิ์ แห่งคณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้กรุณาวิจัยทางคลินิกให้แก่โครงการ.

ท้ายสุดนี้ ดิฉันขอขอบคุณทีมงานทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการดำเนินโครงการวิจัยตลอดระยะเวลา 6 ปี โดยเฉพาะ น.สพ.ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา ที่ได้สละเวลา และใช้ความรู้ความสามารถด้านภูมิคุ้มกัน ศึกษาฤทธิ์ของพืชเปล้าตะวันด้วยความอุตสาหะ ถึงแม้ผลงานชิ้นนี้จะไม่สามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ แต่ผลงานของผู้วิจัยทุกท่านจะเป็นองค์ความรู้ที่มีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อผู้ที่สนใจจะศึกษาต่อไป.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ซ
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	3
1. บทนำ	5
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	9
3. ผลการทดลอง และวิจารณ์	40
4. สรุปผลการทดลอง	90
5. ผลการศึกษาเบื้องต้นทางด้านตลาด และผลกระทบโครงการ	96
6. ข้อเสนอแนะ	97
7. เอกสารอ้างอิง	98

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. อัตราส่วน Mobile phase 34

ตารางที่ 2. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม 40

ตารางที่ 3. ฤทธิ์การกระตุ้นการสร้างไซโทไคน์จากเซลล์ม้ามของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 47

ตารางที่ 4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบในหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับสารแขวนลอย ตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ขนาด 325, 650 และ 1300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับสารแขวนลอยพื้นฐานปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดลอง 48

ตารางที่ 5. ผลการทดสอบฤทธิ์ลดไข้ในหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับสารแขวนลอยตัวอย่าง ทดสอบผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ขนาด 325, 650 และ 1300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับสารแขวนลอยพื้นฐานปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดลอง 49

ตารางที่ 6. ผลการทดสอบฤทธิ์คลายกังวล โดยแสดงเป็นพฤติกรรมของความวิตกกังวลใน light/dark chamber ของสารทดสอบแกรนูลของผลิตภัณฑ์ผสมเปล้าแดง และพุงทะลาย ที่ขนาด 325, 650 และ 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มสารมาตรฐาน (Phenobarbital) 50

ตารางที่ 7. อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ตับ 51

ตารางที่ 8. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ 52

ตารางที่ 9. การวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศผู้หลังจากได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 53

ตารางที่ 10. การวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศเมียหลังจากได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 54

ตารางที่ 11. สรุปการตรวจอาการทางพิษวิทยาของสัตว์ทดลองหลังป้อนตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 55

ตารางที่ 12. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before) 60

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่	13. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)	61
ตารางที่	14. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)	62
ตารางที่	15. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)	63
ตารางที่	16. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)	64
ตารางที่	17. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)	65
ตารางที่	18. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)	66
ตารางที่	19. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)	67
ตารางที่	20. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)	67
ตารางที่	21. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 22. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศเมีย ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after) 68

ตารางที่ 23. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศเมีย ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after) 69

ตารางที่ 24. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before) 70

ตารางที่ 25. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after) 70

ตารางที่ 26. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after) 71

ตารางที่ 27. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before) 71

ตารางที่ 28. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบ (after) 72

ตารางที่ 29. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after) 72

ตารางที่ 30. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน 73

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่	31. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน (กลุ่ม Satellite)	74
ตารางที่	32. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน	74
ตารางที่	33. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน (กลุ่ม Satellite)	75
ตารางที่	34. ผลการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน	79
ตารางที่	35. ผลการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน	80
ตารางที่	36. ผลการตรวจสัญญาณชีพ น้ำหนักตัวและดัชนีมวลกายของอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	81
ตารางที่	37. ผลการตรวจการทำงานของตับ (liver function test) ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	82
ตารางที่	38. ผลการตรวจระดับเอนไซม์การทำงานของเซลล์ตับ n=20 ของอาสาสมัครทั้งหมด ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	83
ตารางที่	39. ผลการตรวจระดับเอนไซม์การทำงานของเซลล์ตับ n=13 ของอาสาสมัครที่ระดับเอนไซม์ตับปกติ ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	84
ตารางที่	40. ผลการตรวจระดับเอนไซม์การทำงานของเซลล์ตับ n=7 (มีแนวโน้มการทำงานของเอนไซม์การทำงานของตับเพิ่มขึ้น) ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่	41. ผลการตรวจการทำงานของไต ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	85
ตารางที่	42. ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	86
ตารางที่	43. ผลการตรวจระดับไขมัน ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	87
ตารางที่	44. ผลการตรวจระดับของ CD4, CD8 และ CD4:CD8 ratio ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน	88

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1. การสร้างไซโทไคน์จากเซลล์ม้าม 41

รูปที่ 2. การกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาวของสมุนไพรพุงทะลายและสารสกัดเปล้าตะวันในหนูขาว 43

รูปที่ 3. ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบสารน้ำของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน (สัปดาห์ที่ 1) 44

รูปที่ 4. ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบสารน้ำของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน (สัปดาห์ที่ 2) 45

รูปที่ 5. ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบพึ่งเซลล์ของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน 46

รูปที่ 6. อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ตับเมื่อสัมผัสสารทดสอบผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันความเข้มข้นต่าง ๆ 51

รูปที่ 7. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูทดลองเพศผู้หลังจากป้อนน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite 56

รูปที่ 8. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูทดลองเพศเมียหลังจากป้อนน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite 57

รูปที่ 9. อัตราการกินอาหารของหนูทดลองเพศผู้หลังจากป้อนน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite 58

รูปที่ 10. อัตราการกินอาหารของหนูทดลองเพศเมียหลังจากป้อนน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite 59

รูปที่ 11. กราฟมาตรฐานสารสกัดเปล้าตะวัน 79

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF ADAPTOGEN FOR HIV PATIENT IMMUNITY

Chantara Phoonsiri, Parkpoom Siriarchavattana, Amonrat Khayangarnnawee, Tuanta Semathong, Wipaporn Phatvej, Saranya Laovitthayanggoon, Sariya Reungpatthanapong, Pattra Ahmadi Pirshahid, Krittiya Thisyakorn, Prapaipat Klungsupya, Rattanasiri Giwanon, Arkachai Tantrawong, Sin Tangsathirapakdee, Sawai Nakakaew, Wicheian Khoeynuak, Thana Srisom, Saowaluk Ruengsri, Wasana Changin, Penjai Semathong, Kanokkarn Chitcharoen and Chuleratana Banchonglikitkul

ABSTRACT

According to the immunostimulating effect of *Scaphium scaphigerum* (G. Don) and *Croton thorelii* Gagnep., this research was aimed to develop an adaptogen for HIV patients from these two medicinal plants. It was expected to help HIV patients against other infectious diseases and get better quality of life. Both preclinical and clinical studies had been performed in this research. Pharmacological studies in immunosuppressed rats revealed that Scaphium powder showed mitogenic activity at 300 mg/kg dosage while *Croton thorelii* extract at 300 mg/kg showed both humoral and cell-mediated immunity response resulted from 3 tested models: heamagglutination antibody test, Delayed-type Hypersensitivity Test and cytokine production *ex-vivo* model. The adaptogen capsule was formulated containing Scaphium powder and Croton extract as active substances and then was studied on pharmacological activities, toxicity and quality control before performing clinical study.

The results of pharmacological studies of adaptogen revealed that its dosage of 1,300 mg/kg into mice stimulated T-lymphocyte and produced significant IL-2 cytokine level more than that of control group. It also had potential to possess antipyretic, antiinflammatory and antianxiety effects. Safety evaluation of this product was conducted by acute oral toxicity test, chronic toxicity test, Hepato-cell toxicity test and Chromosomal aberration test. LD_{50} of adaptogen capsule was higher than 15,000 mg/kg body weight which showed no chromosomal aberration sign at such dose. This product was toxic to hepatic cell line at higher than 2.5 mg/kg dosage. Chronic toxicity test in rats showed no toxic indication compared to control group. Quality control of microbial

contamination of this product was conformed to Ministry of Public Health (2000). 14% Content of diterpene alcohol was used as a marker for chemical quality control and the product shelf life was more than 2 years.

The results of Clinical study Phase I in 20 healthy volunteers revealed that after 28 days of drug administration, 7 volunteers had significant higher liver enzyme levels (AST, ALT) which indicated abnormal functions of liver. The ratio of CD4 : CD8 was also determined in this study and the results showed no indication of immunostimulation. It could be concluded that this adaptogen capsule formulation at dosage of 1,300 mg/day was not safe for human use and hence, was not suitable for commercialization.

วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกัน สำหรับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

ฉันทรา พูนศิริ[1], ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา[2], อมรรัตน์ ขยันการนาวี[2], เตือนตา เสมาทอง[2], วิภาพร พัฒน์เวช[2], ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูล[2], สรียา เรืองพัฒนพงศ์[2], ภัทรา อะหมะดี พีรซะหีด[2], กฤติยา ทิสยากร[2], ประไพภัทร คลังทรัพย์[2], รัตนศิริ จิวานนท์[2], อรรคชัย ตันตราวงศ์[2], สิน ตั้งสถิรภักดี[2], ไสว นาคาแก้ว[2], วิเชียร เขยนอก[2], ธนา ศรีสม[2], เสาวลักษณ์ เรืองศรี[2], วาสนา ชังอินทร์[2], เพ็ญใจ เสมาทอง[2] กนกกาญจน์ ชิตเจริญ[2] และ ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล[2]

บทคัดย่อ

มีการรายงานฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสมุนไพรพุงทะลายและเปล้าตะวัน. ผู้วิจัยจึงนำสมุนไพรทั้งสองมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเพิ่มภูมิคุ้มกันให้แก่ผู้ป่วย HIV, เพื่อช่วยให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้นและไม่ติดเชื้อแทรกซ้อนได้โดยง่าย. การวิจัยนี้ ทำทั้งขั้นก่อนคลินิกและขั้นคลินิก. ผลการศึกษาขั้นก่อนคลินิกในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน พบว่า สมุนไพรพุงทะลายที่ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงฤทธิ์ mitogenic activity. ในขณะที่เปล้าตะวันที่ระดับ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์เพิ่มภูมิคุ้มกันทั้งในแบบสารน้ำด้วยการทดสอบวิธี heamagglutination antibody test และแบบพึ่งเซลล์, ด้วยการทดสอบวิธี delayed-type-hypersensitivity test และ cytokine production *ex-vivo* model. สมุนไพรทั้งสองชนิดถูกนำมาพัฒนาสูตรให้อยู่ในรูปแกรนูลบรรจุในแคปซูล, แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, พิษวิทยา และควบคุมการลดอาการอักเสบและฤทธิ์การคลายกังวล.

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันที่ขนาด 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ให้ผลในการกระตุ้น T-lymphocyte และสร้างไซโทไคน์ชนิด IL-2 ได้เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม. นอกจากนั้น ยังมีแนวโน้มในการลดไข้, ลดการอักเสบ และคลายกังวล. ส่วนการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์นั้น ได้ทำทั้งในระดับความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก, ความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง, การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ และการทดสอบความเป็นพิษต่อโครโมโซม. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่างๆ พบว่า ผลิตภัณฑ์มีค่า LD_{50} มากกว่า

---

[1] ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

[2] ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ วว.

15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อโครโมโซม, ผลิตภัณฑ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับที่ขนาดมากกว่า 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม. การได้รับผลิตภัณฑ์เป็นเวลานาน 90 วันไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม. นอกจากนั้น ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันยังผ่านเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตาม กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2543. ผลการควบคุมคุณภาพทางเคมี พบว่า ผลิตภัณฑ์มีปริมาณสาร diterpene alcohol 14% และมีอายุการเก็บรักษามากกว่า 2 ปี.

ผลการศึกษาทางคลินิก เฟส 1 ในอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง จำนวน 20 คน โดยให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1,300 มิลลิกรัมต่อวัน ติดต่อกันนาน 28 วัน พบว่า มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของตับ, ทำให้อาสาสมัคร 7 ราย มีค่าเอนไซม์ตับ (AST และ ALT) สูงขึ้นกว่าปกติ. จากการศึกษา ค่า CD4 : CD8 ไม่พบว่า มีการเพิ่มขึ้น. จากการศึกษาในเฟส 1 จึงสรุปว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในขนาด 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีความไม่ปลอดภัยที่จะใช้ในมนุษย์, จึงไม่สามารถดำเนินการขยายผลในเชิงพาณิชย์ได้.

1. บทนำ

มนุษย์เรามีภูมิคุ้มกันมาตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา, โดยได้รับสารภูมิคุ้มกันจากมารดาทางรก, เมื่อคลอดออกมา จะได้รับทางน้ำนมมารดา. หลังจากนั้นร่างกายจะค่อยๆ พัฒนาระบบภูมิคุ้มกันขึ้นโดยอาศัยการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ในสภาพแวดล้อม. เมื่ออายุย่างเข้าสู่วัยชรา, ระบบภูมิคุ้มกันจะค่อยๆ ลดลง. โดยปกติ ร่างกายมนุษย์มีระบบภูมิคุ้มกันด่านแรก คือ ผิวหนัง, เยื่อบุต่างๆ, สารคัดหลั่ง, น้ำตา, น้ำลาย, น้ำย่อย, เป็นต้น และเมื่อสิ่งแปลกปลอมผ่านด่านเหล่านี้เข้าไปได้ จะไปพบระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย 2 ระบบใหญ่ๆ คือ:

1. Non-specific immune response เป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีง่ายๆ และจะใช้วิธีนี้ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่พบเป็นครั้งแรก. การป้องกันในระบบนี้เป็นหน้าที่ของเซลล์ที่จับกินสิ่งแปลกปลอม เช่น phagocyte, natural killer cell และโปรตีนจำพวก complement.

2. Specific immune response เป็นการกำจัดที่มีกลไกยุ่งยากกว่าระบบแรก. เซลล์ที่มีหน้าที่รับผิดชอบในด่านนี้ คือ lymphocytes. สิ่งแปลกปลอมในที่นี้ จะมีชื่อใหม่เรียกว่า antigen และร่างกายจะตอบสนองด้วย antibody. การตอบสนองดังกล่าว แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ:

2.1 Humoral immune response เป็นการตอบสนองอิมมูนโดยการใช้สารน้ำ (antibody). เซลล์ที่รับผิดชอบในเรื่องนี้คือ B-lymphocytes และ plasma cell, รวมทั้ง complement ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในซีรัม.

2.2 Cell-mediated immune response หรือ cellular immunity เป็นการตอบสนองทางอิมมูนโดยการใช้เซลล์. เซลล์ที่รับผิดชอบคือ T- lymphocytes หรือ thymus-derived lymphocyte.

การตอบสนองใน antigen เกือบทุกชนิด จะมีทั้ง cellular immunity และ humoral immunity เกิดขึ้นไปด้วยกันเสมอ. แต่ T-lymphocyte จะไวต่อ antigen มากกว่า B-lymphocyte และมักทำงานโดยได้ข้อมูลมาจาก B-lymphocyte. cellular immunity จะมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย, เชื้อรา, ไวรัส และยังคอยตรวจตราดูแลเซลล์ผิดปกติ จำพวกเนื้องอกอีกด้วย. เมื่อใดที่ร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานปกติ, ร่างกายของเราจะแข็งแรง, ไม่เป็นโรค. แต่เมื่อใดที่ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายเราอ่อนแอลง, เราจะติดเชื้อโรคต่างๆ ได้โดยง่าย (เมฆมณี 2538).

คนไข้โรคเอดส์เป็นผู้ที่ได้รับเชื้อไวรัส HIV (human immuno-deficiency virus) เข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะทางกระแสเลือดหรือสารคัดหลั่ง. ไวรัสตัวนี้จะเข้าไปทำลายระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ CD-4+T cell

ในร่างกายผู้ป่วยลดลงจากปกติ 400 เซลล์/ไมโครลิตร เหลือเพียง 200 เซลล์/ไมโครลิตร. ในขณะเดียวกันเชื้อไวรัสตัวนี้จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ (ปริมาณ viral load สูง), ผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอลง, ติดเชื้อโรคต่างๆ ได้โดยง่าย, โดยเฉพาะเชื้อวัณโรคทางเดินหายใจ, ซึ่งเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในปัจจุบัน.

นับถึงปัจจุบัน พบว่า มีผู้ติดเชื้อเอดส์ทั่วโลกแล้วประมาณ กว่า 60 ล้านคน. ศูนย์ข้อมูลระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค (2555) รายงานว่า ในระหว่างปี พ.ศ. 2527- 2554 ประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อเอดส์ทั้งสิ้น 1,138,020 ราย และมีผู้ป่วยเอดส์ 376,690 ราย ซึ่งเสียชีวิตแล้ว 98,721 ราย. ถึงแม้ว่า ประเทศไทยจะมีจำนวนผู้ป่วยใหม่ลดลงและมีอัตราการตายต่ำ เนื่องจากผู้ป่วยได้รับยาต้านไวรัส, แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุอยู่ในวัยทำงาน คือระหว่าง 20-49 ปี ทำให้บุคลากรที่เป็นกำลังสำคัญของชาติมีคุณภาพด้อยลง. นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อไวรัส HIV ที่พบในประเทศไทยมากกว่าร้อยละ 90 เป็น subtype E, ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบน้อยกว่าร้อยละ 3 ในโลก, ซึ่งจะต้องใช้ยาต้านไวรัสที่แตกต่างจากที่ผลิตให้กับส่วนใหญ่ในโลก. อย่างไรก็ดี ไวรัสชนิดนี้ไม่ได้เป็นตัวการทำให้ผู้ป่วยตาย. แต่ผู้ป่วยจะตายได้จากเชื้อฉวยโอกาสโดยเฉพาะ. ในปัจจุบัน พบว่า มีผู้ป่วยวัณโรคทางเดินหายใจเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง. การรักษาผู้ป่วยเอดส์ จึงต้องใช้ทั้งยาต้านไวรัสและยารักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาส, เนื่องจากผู้ป่วยจะมีภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง. นอกจากนี้ การพยายามสร้างสภาพร่างกายผู้ป่วยให้แข็งแรงและได้รับการดูแลเอาใจใส่จากคนใกล้ชิด, การให้ผู้ป่วยได้รับการโภชนาที่ดีและการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยกระตุ้นให้ผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันร่างกายที่แข็งแรงขึ้น.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้สารปรับปรุงภูมิคุ้มกันมีหลายชนิด ได้แก่:

- สารจากธรรมชาติ เช่น วัคซีน BCG สารจากจุลินทรีย์, ฮอร์โมนจากต่อมไทมัส
- Cytokines ซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีนที่สร้างโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น Interferons, Interleukins.
- สารสังเคราะห์ เช่น levamisole, isoprinosine.
- อื่นๆ เช่น เอนไซม์จากลำไส้วัว pegademase, bovine antibodies.

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ถูกนำมาใช้ในหลายสถานการณ์ ได้แก่ โรคที่เกี่ยวกับภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง, ทั้งที่เป็นมาแต่กำเนิดและเกิดขึ้นภายหลัง รวมทั้งโรคเอดส์, โรคมะเร็ง และโรคติดเชื้อ. การรักษาโรคเอดส์ในปัจจุบันยังอาศัยยาต้านเรโทรไวรัส เป็นหลัก, ซึ่งเชื้อไวรัสมักดื้อยาได้โดยง่าย. แต่การเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้นเป็นวิธีการที่จะช่วยเสริมผลการรักษาและยังช่วยป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยอีกด้วย (เมฆมณี 2538).

แนวทางในการนำพืชสมุนไพรมาใช้ดูแลรักษาผู้ป่วยได้รับความสนใจทั้งซีกโลกตะวันตกและตะวันออก. Wu (1992) รายงานว่า มีความร่วมมือของแพทย์ในสหรัฐอเมริกาและจีนในการนำยาจากสมุนไพร (traditional chinese medicine) มาใช้รักษาผู้ป่วยเอดส์, สามารถทำให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวกว่า 2 ปี ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยาดังกล่าวเสียชีวิตหมดในช่วงเวลา 2 ปีนั้น. องค์การเภสัชกรรมของไทยมีการวิจัยยาจากสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคเอดส์เป็นยาสมุนไพรตำรับและพัฒนาต่อด้วยกรรมวิธีผลิตยาแผนปัจจุบันจากสมุนไพร, นำไปใช้ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอดส์และคนไข้โรคเอดส์ ใช้ชื่อทางการค้าว่า Cordex และ Natur-plex (ศิริแสงเลิศ 2555).

วว. ได้ดำเนินงานโครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากพืช, ผัก, ผลไม้ และสมุนไพรไทย ที่มีฤทธิ์เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน. โดยทำการคัดเลือกพืชกลุ่มดังกล่าวจำนวน 20 ชนิด และพบว่าพุงทะลายเป็นพืชที่มีศักยภาพดี, ให้ผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันเทียบเท่าสารควบคุมบวก (levamisole), จึงน่าจะนำมาพัฒนาเป็นสารปรับสมดุลเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ผู้ติดเชื้อ HIV หรือผู้ป่วยเอดส์. นอกจากนี้ ยังได้สนใจพืชชนิดใหม่ ได้แก่ เปล้าตะวัน, ซึ่งมีการใช้เป็นยาแผนโบราณในจังหวัดตราด, มีสรรพคุณรักษาโรคกระเพาะ, ลดไข้ และรักษาโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น โรคสะเก็ดเงิน, จึงได้นำมาศึกษาในโครงการวิจัยนี้ด้วย.

พุงทะลายหรือสำรอง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Scaphium scaphigerum* Linn. เป็นไม้ดั้งเดิมของไทย. ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ สูงชะลูดประมาณ 30-40 เมตร, แตกกิ่งก้านสาขาเฉพาะส่วนยอด. ใบเดี่ยวติดกับลำต้นแบบสลับ, รูปร่างใบคล้ายรูปไข่, ปลายเรียวแหลม, โคนใบมนหรือเว้าเล็กน้อยเป็นรูปหัวใจ, ใบต้นอ่อนมักเป็นหยักมี 3 - 5 หยัก. ดอกสีแดงออกรวมกันเป็นช่อใหญ่ มีทั้งดอกตัวผู้และดอกสมบูรณ์. ผลมีลักษณะกลมรีคล้ายผลสมอแห้ง ขนาดกว้าง 1-1.5 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร, มีปีกบางเรียกว่า ตะเภา ซึ่งมีลักษณะโค้งงอคล้ายเรือ ความยาว 12-16 เซนติเมตร ติดอยู่ตรงกลางโคนผล. ผลอ่อนสีเขียวปีกสีเขียวอ่อน, เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาล, ผิวขรุขระร่วงหล่นจากต้นพร้อมปีก. ผลแก่เมื่อนำมาแช่น้ำ เปลือกจะแตก และเนื้อในจะพองบานลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ นุ่มและหยุ่น, สีน้ำตาลแก่, มีสรรพคุณแก้ร้อนใน, กระหายน้ำ และมีการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ว่า มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ม.ป.ป.).

เปล้าตะวัน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Croton thorelii* Gagnep และชื่อวงศ์ EUPHORBIACEAE. มีสรรพคุณทางยาไทย คือ นำมาใช้ประโยชน์เพื่อรักษาโรคกระเพาะอาหาร, บรรเทาอาการไอ, โรคริดสีดวงทวาร และ

อาการอักเสบภายใน. สมุนไพรเปล้าตะวันพันธุ์ตราด 1 เพิ่งได้รับการขึ้นทะเบียนรับรองพันธุ์พืชของกรมวิชาการเกษตรเมื่อปี พ.ศ. 2548. โดยมีการรายงานลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ ดังนี้.

ประเภท ไม้พุ่ม

ลำต้น ต้นมีความสูง 2-4 เมตร, มีสีชมพูอมแดง, เปลือกเรียบ. ลักษณะการแตกกิ่งทำมุม 45 องศา, แตกกิ่งน้อยบริเวณใกล้โคนต้น และแตกกิ่งมากบริเวณยอดกิ่ง, มีสีชมพูอมแดง.

ใบ ใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ความกว้าง 4-6 เซนติเมตร ความยาว 10-15 เซนติเมตร, โคนใบเรียว, ปลายใบแหลม, แผ่นใบด้านบนและด้านล่างมีสีเขียว, แผ่นใบมีขนรูปดาว, จำนวนเส้นใบย่อยมี 10-12 คู่, เส้นใบหลักมีเส้นกลาง 1 เส้น.

ดอก ออกดอกบริเวณใกล้ยอด, ดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน. ดอกเพศผู้ส่วนใหญ่มีกลีบรองกลีบดอก 5 กลีบ, รูปดอกค่อนข้างกว้าง, ปลายแหลม, ด้านนอกมีขนสีน้ำตาลอมเหลือง, ที่ขอบกลีบมีขน, ฐานดอกมีขนยาว, เกสรเพศผู้มี 15-20 อัน. ดอกเพศเมียมีกลีบรองกลีบดอกลักษณะเหมือนเพศผู้, รังไข่มีขนรูปดาวหนาแน่น, สีน้ำตาลอมเหลือง, ปลายเกสรเพศเมียสั้น.

ผล ผลกลม, มี 3 ผลเล็กๆ อยู่รวมกัน ยาว 3-5 มิลลิเมตร, มีขนรูปดาว, เมล็ดยาว 2-3 มิลลิเมตร, ผิวเรียบ, มีลายตามยาวสีขาวและปนน้ำตาล.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

ตัวอย่างทดสอบที่ใช้ในโครงการนี้ ได้แก่ สารสกัด 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล, เปล้าตะวันและ ผงพุงทะลายแห้ง แสดงรายละเอียดกรรมวิธีการผลิตอยู่ในสิทธิบัตรของ วว. ส่วนผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันประกอบด้วยสารสกัดเปล้าตะวัน 150 มิลลิกรัม และผงพุงทะลาย 7.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักผลิตภัณฑ์ 650 มิลลิกรัม.

2.1.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของสารสกัดเปล้าตะวัน

1. สารสกัดเปล้าตะวัน.
2. สัตว์ทดลอง: หนูขาวเพศผู้และเพศเมีย พันธุ์ Sprague Dawley, ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม. น้ำหนักตัวเริ่มต้นสำหรับหนูทดลองเพศผู้อยู่ระหว่าง 208-263 กรัม และหนูเพศเมียอยู่ระหว่าง 178-210 กรัม.
3. อาหารสัตว์ บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ (ประเทศไทย) จำกัด.
4. น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.
5. น้ำกลั่น.
6. เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
7. กรรไกรผ่าตัด, สำลี, แอลกอฮอล์.
8. กระบอกฉีดยาขนาด 1 - 5 มิลลิลิตร.
9. หลอดป้อนเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม.
10. Tragacanth, บริษัท ศรีจันทร์ สหโอสถ จำกัด (ประเทศไทย).

2.1.2 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

1. สารสกัดเปล้าตะวัน.
2. สัตว์ทดลอง: หนู ICR mice เพศเมีย น้ำหนัก 25±5 กรัม, ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.
3. เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
4. Auto Pipette ขนาด 100, 200, 1,000 และ Multi-channel (Nichiryo Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น.
5. กล้องจุลทรรศน์ Nikon, ประเทศญี่ปุ่น.

6. Microcentrifuge, Microfuge 11 BECKMAN, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

7. NUNC-immunoplate, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.

8. กระบอกฉีดยาขนาด 1, 3, 5 และ 10 มิลลิลิตร Nipro,® Nissho, Nipro Co., Ltd., ประเทศไทย.

9. เข็มฉีดยาชนิดใช้แล้วทิ้ง No. 26 G, Nipro,® Nissho, Nipro Co.Ltd., ประเทศไทย.

10. หลอดพลาสติกสำหรับเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, NUNCประเทศเดนมาร์ก.

11. สำลี, แอลกอฮอล์.

12. ขวดเตรียมสารขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.

13. Levamisole hydrochloride, Sigma, ประเทศเยอรมนี.

14. 0.9% Normal saline (NSS) สำหรับฉีด General Hospital Products Public Co., Ltd., ประเทศไทย.

15. Ovalbumin, Sigma chemical Co., Ltd., ประเทศเยอรมนี.

16. Cyclosporin A, Novatis, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

17. Cell culture medium, RPMI 1640, Gibco invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

18. BD optEIA™ mouse IL-2 ELISA set, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

19. Substrate Reagent A, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

20. Substrate Reagent B, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

21. Coating buffer Sodium carbonate pH 9.5, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

22. Stop solution, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

23. Wash concentration, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

24. Penstreptomycin, Gibco, invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

25. Heat inactivated fetal bovine serum, Gibco, invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

26. 2-mercaptoethanol, Gibco, invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

27. Trypan blue stain 0.4%, Gibco, invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

28. Cell strainer 100 µm nylon, BD Falcon, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

29. 24- well cell culture cluster, Corning, NY, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

30. Phosphate buffer saline, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

2.1.3 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผงพุงทะลายและสารสกัดเปล้าแดงในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

1. ผงพุงทะลาย, สารสกัดเปล้าตะวัน.
2. สัตว์ทดลอง: หนู Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 220-280 กรัม และหนู ICR mice เพศเมีย น้ำหนัก 25±5 กรัม, ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.
3. อาหารสัตว์ บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ ประเทศไทย จำกัด.
4. น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.
5. น้ำกลั่น.
6. เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
7. Auto Pipette ขนาด 100, 200, 1,000 และ Multi-channel, Nichiryo Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น.
8. กล้องจุลทรรศน์, Nikon, ประเทศญี่ปุ่น.
9. Microcentrifuge, Microfuge 11, BECKMAN, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
10. Microwell plate 96 well V Shape disposable, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.
11. หลอดพลาสติกสำหรับเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.
12. เข็มป้อนอาหารสัตว์ทดลอง (feeding needles), สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม, ประเทศไทย.
13. กระบอกฉีดยาขนาด 1, 3, 5 และ 10 มิลลิลิตร, Nipro,® Nissho, Nipro Co., Ltd., ประเทศไทย.
14. เข็มฉีดยาชนิดใช้แล้วทิ้ง No. 26 G, Nipro,® Nissho, Nipro Co., Ltd., ประเทศไทย.
15. สำลี, แอลกอฮอล์.
16. ขวดเตรียมสารขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.
17. Levamisole hydrochloride, Sigma, ประเทศเยอรมนี.
18. 0.9% Normal saline (NSS) สำหรับฉีด, General Hospital Products Public Co., Ltd., ประเทศไทย.
19. เม็ดเลือดแดงแกะ Sheep Red Blood Cell (SRBC) in Alsever's solution, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย.
20. Dial thickness meter, Mitutoyo, ประเทศญี่ปุ่น.

21. Ovalbumin, Sigma, ประเทศเยอรมนี.

22. Complete Freund's Adjuvant, Sigma, ประเทศเยอรมนี.

23. Incomplete Freund's Adjuvant, Sigma, ประเทศเยอรมนี.

24. Cyclophosphamide, Baxter, ประเทศเยอรมนี.

25. Cyclosporin A, Novatis, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

2.1.4 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

1. ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน (แกรนูล สีเขียวเข้ม).

2. สัตว์ทดลอง: หนู BALB/c mice เพศเมีย น้ำหนัก 20±5 กรัม, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย.

3. เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

4. Auto Pipette ขนาด 100, 200, 1,000 และ Multi-channel, Nichiryo Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น.

5. กล้องจุลทรรศน์, Nikon, ประเทศญี่ปุ่น.

6. Microcentrifuge, Microfuge 11, BECKMAN, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

7. NUNC-immunoplate, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.

8. กระบอกฉีดยาขนาด 1, 3, 5 และ 10 มิลลิลิตร, Nipro,® Nissho, Nipro Co., Ltd., ประเทศไทย.

9. เข็มฉีดยาใช้แล้วทิ้ง No. 26 G, Nipro,® Nissho, Nipro Co., Ltd., ประเทศไทย.

10. หลอดพลาสติกสำหรับเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.

11. สำลี, แอลกอฮอล์.

12. ขวดเตรียมสารขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร, NUNC, ประเทศเดนมาร์ก.

13. Levamisole hydrochloride, Sigma, ประเทศเยอรมนี.

14. 0.9% Normal saline (NSS) สำหรับฉีด, General Hospital Products Public Co., Ltd., ประเทศไทย.

15. Ovalbumin, Sigma, ประเทศเยอรมนี.

16. Cyclosporin A, Novatis, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

17. Cell culture medium, RPMI 1640, Gibco invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

18. BD optEIA™ mouse IL-2 ELISA set, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

19. Substrate Reagent A, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

20. Substrate Reagent B, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

21. Coating buffer Sodium carbonate pH 9.5, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

22. Stop solution, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

23. Wash concentration, BD bioscience, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

24. Penstreptomycin, Gibco, invitrogen.

25. Heat inactivated fetal bovine serum, Gibco, invitrogen.

26. 2-mercaptoethanol, Gibco, invitrogen.

27. Trypan blue stain 0.4%, Gibco, invitrogen.

28. Cell strainer 100 µm nylon, BD Falcon, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

29. 24- well cell culture cluster, Corning, NY, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

30. Phosphate buffer saline, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

2.1.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของผลิตภัณฑ์ เปล้าตะวัน

1. ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน (แกรนูลสีเขียวเข้ม)

2. สัตว์ทดลอง: หนูขาวพันธุ์ Wistar ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม. หนูทุกกลุ่มใช้หนูเพศผู้เพศละ 6-8 ตัว, น้ำหนักตัวหนูที่ใช้ในการทดลองสำหรับหนูเพศผู้อยู่ระหว่าง 180-220 กรัม.

3. อาหารสัตว์ บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ (ประเทศไทย) จำกัด.

4. น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.

5. น้ำกลั่น.

6. เครื่องชั่ง OHAUS, รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

7. กรรไกรผ่าตัด, สำลี, แอลกอฮอล์.

8. กระบอกฉีดยาขนาด 1-5 มิลลิลิตร.

9. หลอดป้อนเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม.

10. Phenylbutazone Batch No. S-97003, บริษัท Jiangsu Medicines ประเทศจีน.

11. Carrageenan, บริษัท SIGMA Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา.

12. 0.9% Normal saline, General Hospital Products Public Co., Ltd., ประเทศไทย.

13. Carboxymethylcellulose, HONGHUAT Co., Ltd., ประเทศไทย.

14. Plythysmometer, บริษัท Ugo Basile, Biological Research Apparatus, 7140 ประเทศอิตาลี.

2.1.6 การทดสอบฤทธิ์ลดไข้ของผลิตภัณฑ์ เปล้าตะวัน

1. ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน (แกรนูลสีเขียวเข้ม).
2. สัตว์ทดลอง: หนูขาวพันธุ์ Wistar ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม. หนูทุกกลุ่มใช้หนูเพศผู้เพศละ 8 ตัว, น้ำหนักตัวหนูที่ใช้ในการทดลองสำหรับหนูเพศผู้อยู่ระหว่าง 180-220 กรัม.
3. อาหารสัตว์ บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ (ประเทศไทย) จำกัด.
4. น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.
5. น้ำกลั่น.
6. เครื่องชั่ง OHAUS, รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
7. กรรไกรผ่าตัด, สำลี, แอลกอฮอล์.
8. กระบอกฉีดยาขนาด 1-5 มิลลิลิตร.
9. หลอดป้อนเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม.
10. Diclofenac, SIGMA Chemical Co., Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา.
11. Brewer yeast, Sigma Chemical Co., Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา.
12. 0.9% Normal saline, General Hospital Products Public Co., Ltd., ประเทศไทย.
13. Carboxylmethylcellulose, HONGHUAT Co., Ltd., ประเทศไทย.
14. เครื่องวัดอุณหภูมิ; Thermistor thermometer Model No. 600-1070, บริษัท Barnant ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.1.7 การทดสอบฤทธิ์คลายกังวลของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

1. สัตว์ทดลองหนูถีบจักร (ICR mouse) น้ำหนัก 36 $\pm$ 10 กรัม เพศผู้ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.
2. สารทดสอบ
   2.1 ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน (แกรนูลสีเขียวเข้ม).
   2.2 สารมาตรฐาน Phenobarbital.
   2.3 Acacia, บริษัท ศรีจันทร์สหโอสถ, ประเทศไทย.
   2.4 Corticosterone, Sigma Co., Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา.

2.5 เอทานอล 0.3 เปอร์เซ็นต์ Ethanol, กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย.

2.6 Light/dark chamber (ประดิษฐ์ขึ้นใช้เองในฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยประยุกต์จากวิธีการของ Ardayfio and Kim (2006).

2.7 อาหารหนูทดลอง, บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ (ประเทศไทย) จำกัด.

2.8 น้ำดื่มสัตว์ทดลองเป็นน้ำกรอง.

2.9 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง, AND, ประเทศญี่ปุ่น.

2.1.8 การทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันต่อเซลล์ชนิด HepG2; a human liver hepatocarcinoma cell line

1. ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน (แกรนูลสีเขียวเข้ม).
2. เซลล์ตับชนิด HepG2 : a human liver hepatocarcinoma cell line (ATCC No.HB 8065).
3. อาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อชนิดเซลล์ตับ
   - 3.1 Minimum essential media, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
   - 3.2 Fetal Bovine serum, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
   - 3.3 Phosphate buffered saline (PBS), บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
   - 3.4 Penicillin/Streptomycin, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
   - 3.5 L-glutamine, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
   - 3.6 Sodium pyruvate, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
   - 3.7 Non-essential amino acid, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
   - 3.8 0.05% Trypsin-versene (Trypsin/EDTA), บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
   - 3.9 Trypan blue 0.4%, บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

4. สารเคมีสำหรับทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

   4.1 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, (MTT) (บริษัท GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

   4.2 Dimethyl sulfoxide, บริษัท Sigma Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

5. Ultrasonic bath, บริษัท Astrason, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
6. Laminar airflow hood, บริษัท SANYO, MCV-13BSF, ประเทศญี่ปุ่น.
7. CO_2 Incubator, บริษัท SHELLAB, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
8. Haemocytometer, บริษัท BOECO, ประเทศเยอรมนี.

9. Autoclave, บริษัท SANTO Labo Autoclave, ประเทศญี่ปุ่น.

10. 96-well plate, บริษัท Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

11. Balance AG204, บริษัท Mettler Toledov, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

12. Microplate reader, บริษัท Genios Plus, TECAN, ประเทศออสเตรีย.

2.1.9 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

1. ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน (แกรนูลสีเขียวเข้ม)

2. สัตว์ทดลอง : หนูขาวเพศผู้และเพศเมีย พันธุ์ Wistar ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม. น้ำหนักตัวเริ่มต้นสำหรับหนูทดลองเพศผู้อยู่ระหว่าง 205-235 กรัม และหนูเพศเมียอยู่ระหว่าง 159-192 กรัม.

3. อาหารสัตว์ บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ (ประเทศไทย) จำกัด.

4. น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.

5. น้ำกลั่น.

6. เครื่องชั่ง OHAUS, รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

7. กรรไกรผ่าตัด, สำลี, แอลกอฮอล์.

8. กระบอกฉีดยาขนาด 1 - 5 มิลลิลิตร.

9. หลอดป้อนเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม.

2.1.10 การทดสอบผลของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันที่มีต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว

1. ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน (แกรนูลสีเขียวเข้ม).

2. สัตว์ทดลอง : หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้และเพศเมีย อายุ 5-7 สัปดาห์ ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.

3. อาหารสัตว์ บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ (ประเทศไทย) จำกัด.

4. น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.

5. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ.

6. เครื่องชั่ง OHAUS, รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

7. เข็มฉีดยาขนาด 26 × 0.5 นิ้ว (Nipro (Thailand) Co., Ltd., ประเทศไทย.

8. กระบอกฉีดยาขนาด 1-5 มิลลิลิตร (Nipro (Thailand) Co., Ltd., ประเทศไทย.

9. หลอดป้อนเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม, ห้างหุ้นส่วนจำกัด คลอเตอร์แล็ป อินสทรูเม้นท์, ประเทศไทย.

10. Colchicine, Sigma-Aldrich Co., Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา.

11. Cyclophosphamide (CP), Baxter, ประเทศเยอรมนี.

12. Glacial acetic acid, Merck Inc., ประเทศเยอรมนี.

13. Potassium chloride, Merck Inc., ประเทศเยอรมนี.

14. Potassium dihydrogen phosphate, Merck Inc., ประเทศเยอรมนี.

15. Sodium dihydrogen phosphate dehydrate, Merck Inc., ประเทศเยอรมนี.

16. Giemsa's stain, GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา

17. Methyl alcohol anhydrous, Merck Inc., ประเทศเยอรมนี.

18. Xylene, Merck Inc., ประเทศเยอรมนี.

19. Hank's Balanced Salt solution (without $NaHCO_3$), Sigma-Aldrich Co., Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา.

20. Glycerine, Merck Inc., ประเทศเยอรมนี.

21. Permount, Fish Scientific Corp., ประเทศสหรัฐอเมริกา.

22. Slide and cover slip, Brand®, ประเทศเยอรมนี.

2.1.11 การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน

1. ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (แกรนูลสีเขียวเข้ม).

2. สัตว์ทดลอง : หนูขาวพันธุ์ Wistar อายุ 6 สัปดาห์ เพศผู้และเพศเมีย กลุ่มละ 20 ตัว เพศละ 10 ตัว ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.

3. อาหารสัตว์ บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ (ประเทศไทย) จำกัด.

4. น้ำดื่มเป็นน้ำกรอง.

5. กรรไกรผ่าตัด, สำลี, แอลกอฮอล์ และถุงมือยางใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง.

6. กระบอกฉีดยาขนาด 1, 3, 5 และ 10 มิลลิลิตร; Nippe®, Nissho Nipper Corporation Ltd., ประเทศไทย.

7. หลอดป้อนเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม.

8. กรงเก็บปัสสาวะ (metabolic cages).

9. Autoclave, Sturdy, ไต้หวัน, ประเทศจีน.

10. น้ำกลั่น.

11. เครื่องปั่นเหวี่ยง, BECKMAN Microfuge™11, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

12. การวิเคราะห์ปัสสาวะตรวจด้วยเครื่อง Urilux S.

13. การวิเคราะห์ค่าเคมีคลินิกในเลือดส่งตรวจที่ กรุงเทพ อาร์ ไอ เอ แล็บ, ประเทศไทย.

14. ฟอร์มาลิน 40 เปอร์เซ็นต์, ประเทศไทย.
15. Na_2HPO_4 Merck, ประเทศเยอรมนี.
16. $NaH_2PO_4.H_2O$ Merck, ประเทศเยอรมนี.
17. เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
18. เครื่องชั่งสัตว์ทดลอง Mettler Toledo รุ่น PG-S, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.

2.1.12 การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

2.1.12.1 ด้านเคมี

1. สารมาตรฐาน plaunotol ในยา Kelnac capsule ของบริษัท ซังเกียว ประเทศญี่ปุ่น.
2. เครื่อง HPLC, Water 2695, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
3. Hexane HPLC grade, Lab Scan.
4. Dichloromethane grade, Lab Scan.
5. เครื่อง HPLC, ยี่ห้อ Water รุ่น Water 600 Controller.
6. Column : Nova-Pak Silica 3.9x150 nm.
7. Mobile phase : Hexane: Dichloromethane.
8. Detector : UV Water 486 : λ 251 nm ประมวลผล Clarity.
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler.

2.1.12.2 ด้านจุลชีววิทยา

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ได้แก่ Soybean-casein digest agar, บริษัท Himedia, ประเทศอินเดีย.
2. สารเคมีเพื่อใช้เตรียมตัวอย่างทดสอบตามวิธี กระทรวงสาธารณสุข (2538) ได้แก่ Buffered Sodium Chloride-Peptone Solution pH 7.
3. ตู้ปลอดเชื้อระดับ 2 (laminar class II), บริษัท Hereus, ประเทศเยอรมนี.
4. เครื่องชั่ง ความละเอียด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น EK 120i, บริษัท AND, ประเทศญี่ปุ่น.
5. เครื่องชั่ง ความละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 160 P, บริษัท Sartorius, ประเทศเยอรมนี.
6. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ, บริษัท Sanyo, ประเทศญี่ปุ่น.
7. ตู้บ่มเชื้อ (incubator), บริษัท Binders, ประเทศอังกฤษ.
8. เครื่องนับโคโลนี, บริษัท Stuart, ประเทศอังกฤษ.
9. เครื่องมือต่างๆ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ได้แก่ ช้อนตักสาร, ห่วงเขี่ยเชื้อ และเข็มเพาะเชื้อ.

2.1.13 การทดสอบทางคลินิกระยะที่ 1 ในมนุษย์

1. ผลิตภัณฑ์แคปซูลเปล้าตะวัน.
2. อาสาสมัครเพศชายและหญิงอายุระหว่าง 20-45 ปี จำนวน 20 คน.

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของสารสกัดเปล้าตะวัน

ดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันดัดแปลงวิธีทดสอบ OECD

2.2.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูทดลอง 30 ตัว เป็นเพศผู้และเพศเมียเพศละ 15 ตัว. ก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์, นำหนูทดลองมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ, ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50-70 เปอร์เซ็นต์, เพื่อให้หนูทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ. ก่อนวันทดสอบ, แบ่งกลุ่มหนูทดลองโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบจำนวน 3 กลุ่ม. แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้และเพศเมียเพศละ 5 ตัว. หนูทดลองแต่ละตัวได้รับการทำสัญลักษณ์ประจำตัว โดยการแต้มเบอร์ที่หาง และอดอาหารหนูทดลอง 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ แต่ให้น้ำดื่มตามปกติ.

2.2.1.2 การเตรียมตัวอย่างทดสอบและวิธีทดสอบ

ในวันทดสอบ, ชั่งน้ำหนักหนูทดลองทุกตัว. เตรียมตัวอย่างแขวนลอยให้ได้ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก : ปริมาตร) ในสารละลายผสมในอัตราส่วน 1.67:1 (2% tragacath : น้ำมันมะกอก) (ปริมาตร : ปริมาตร). ป้อนตัวอย่างทดสอบทางปากให้หนูกลุ่มทดสอบทั้ง 2 กลุ่ม ในขนาด 2,000 และ 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และป้อนน้ำกลั่นแก่หนูกลุ่มควบคุมด้วยปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ. ภายหลังป้อนตัวอย่างทดสอบครบ 4 ชั่วโมง, ให้อาหารแก่หนูทดลองทุกกลุ่ม.

2.2.1.3 การสังเกตผลการทดสอบ

สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูทดลองที่เวลา 1/2, 1 และ 3 ชั่วโมง. จากนั้น สังเกตอาการอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน.

1. บันทึกน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ชั่งน้ำหนักหนูทดลองแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดสอบ). คำนวณค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูแต่ละกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของข้อมูลเพื่อประเมินผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนูทดลอง.

2. บันทึกความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathology) หนูทดลองที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรงหรือหนูทดลองที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดสอบครบ 14 วัน, ทำการฆ่าโดยการ

ให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และทำการผ่าตัดชันสูตรซากเพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathology).

2.2.1.4 การคำนวณอัตราการตาย

การคำนวณอัตราการตายโดยเทียบจากจำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย/จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบ.

2.2.2 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

2.2.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองเลี้ยงในอาคารสัตว์ทดลองของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิช่วง 24 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส, จัดอาหารและน้ำให้สัตว์ทดลองกินได้ตลอดเวลา. ทำการพักหนูก่อนเริ่มการทดสอบเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน. ในวันทดสอบ, จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายและทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง.

2.2.2.2 การเตรียมสารทดสอบ

1. สารสกัดเปล้าตะวันละลายใน corn oil ในอัตราส่วน 1:1, แล้วเตรียมเป็นสารแขวนลอยใน carboxylmethycellulose 1%. เตรียมความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 3 ระดับ คือ 7.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. สารละลายมาตรฐาน levamisole hydrochloride เตรียมในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

3. Ovalbumin (OVH) เพื่อเป็นแอนติเจน, เตรียมในสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร. เมื่อจะนำมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายจึงผสมด้วย Complete Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1.

4. Cyclosporin A เพื่อเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน, เตรียมในสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ completed RPMI medium ประกอบด้วย RPMI 1640 with L-glutamine, fetal bovine serum 10%, penicillin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, streptomycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 2- mercaptoethanol 25 นาโนโมลาร์.

2.2.2.3 การทดสอบ แบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้.

1. กลุ่ม 1, immunocompetent control, หนูได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OVH และป้อนด้วยน้ำกลั่น.

2. กลุ่ม 2, immunosuppressed control, หนูได้รับยา cyclosporin A (CyA), ฉีด OVH และป้อนด้วยน้ำกลั่น.

3. กลุ่ม 3, เปล้าตะวัน 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, cyclosporin A (CyA), ฉีด OVH และป้อนด้วยเปล้าตะวัน ขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

4. กลุ่ม 4, เปล้าตะวัน 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, cyclosporin A (CyA), ฉีด OVH และป้อนด้วยเปล้าตะวัน ขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

5. กลุ่ม 5, เปล้าตะวัน 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, cyclosporin A (CyA), ฉีด OVH และป้อนด้วยเปล้าตะวัน ขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

6. กลุ่ม 6, levamisole 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, cyclosporin A (CyA), ฉีด OVH และป้อนด้วย levamisole ขนาด 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

หนูทุกตัวยกเว้นกลุ่มที่ 1, จะได้รับยากดภูมิคุ้มกันร่างกาย CyA ในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, โดยการป้อนทางปากเป็นจำนวน 1 ครั้ง, ก่อนเริ่มการฉีดกระตุ้นด้วย OVH เป็นเวลา 2 วัน. ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายด้วย OVH ร่วมกับ complete Freund's adjuvant ในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เข้าทางช่องท้อง. ภายหลังการฉีดแอนติเจนแล้ว 2 ชั่วโมง, จึงทำการป้อนสารทดสอบต่างๆ ตามกลุ่ม วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องกันจนครบ 7 วัน. วันถัดมาจึงทำการเมตตาฆาตด้วยวิธี Cervical Dislocation, แล้วเก็บแยกม้ามออกจากกายด้วยเทคนิคการปลอดเชื้อ.

ทำการแยกเซลล์ม้ามให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย cell strainer และเลี้ยงเซลล์ใน completed RPMI medium. ตรวจสอบ cell viability ด้วยเทคนิค typan blue dye exclusion. นับจำนวนเซลล์ม้ามด้วย hemocytometer. แล้วเตรียมเซลล์ม้ามที่ได้ให้มีความหนาแน่นเท่ากับ 10^7 เซลล์/ มิลลิลิตร. นำเซลล์ม้ามของหนูแต่ละตัวปริมาตร 2 มิลลิลิตร เลี้ยงลงใน 24–well cell culture cluster ที่มี OVH ผสมอยู่ในความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร. บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง. เมื่อครบเวลาจึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant) ไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส.

ทำการวัดปริมาณ ไซโทไคน์ IL-2 ใน supernatant ด้วยวิธี sandwich enzyme immunoassay (OptEIA® ELISA set). วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (genios plus) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร.

2.2.3 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผงพุงทะลายและสารสกัดเปล้าแดงในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

2.2.3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เหมือนกับ 2.2.2.1

2.2.3.2 การเตรียมสารทดสอบ

1. สารทดสอบเตรียมเป็นสารแขวนลอยใน tragacant 2%. สำหรับสารสกัดเปล้าตะวันเตรียมขึ้นเป็นความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 7.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร. สำหรับสมุนไพรพุงทะลายเตรียมเป็น 3 ระดับ คือ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

2. สารละลายมาตรฐาน levamisole hydrochloride เตรียมขึ้นในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

3. เม็ดเลือดแดงแกะ เพื่อเป็นแอนติเจน, เตรียมให้ได้ความหนาแน่นเท่ากับ $1X10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร. โดยนำมาปั่นล้างในสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง เพื่อแยกส่วนซีรัมออกไป. นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย haemocytometer, ก่อนปรับปริมาตรให้ได้ตามความต้องการด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์.

4. Ovalbumin เพื่อเป็นแอนติเจน, เตรียมขึ้นในสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร. เมื่อจะนำมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกาย จึงผสมด้วย complete Freund's adjuvant หรือ incomplete Freund's adjuvant ในปริมาณเท่าๆ กัน.

5. Cyclophosphamide เพื่อเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน, เตรียมขึ้นในสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

6. Cyclosporin A เพื่อเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน, เตรียมขึ้นในสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

2.2.3.3 วิธีการทดลอง

1. การศึกษาฤทธิ์ mitogenic activity ของสมุนไพรต่อการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาวในสัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้, น้ำหนักระหว่าง 250±30 กรัม, จำนวน 28 ตัว, แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 7 ตัว. กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มควบคุม, กลุ่ม 2 เป็นกลุ่มทดสอบสมุนไพรพุงทะลาย ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 3 เป็นกลุ่มทดสอบสมุนไพรพุงทะลาย ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ สารสกัดเปล้าตะวัน 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 4 เป็นกลุ่ม levamisole ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม. ทำ

การป้อนสารทดสอบต่างๆ ตามกลุ่มติดต่อกัน 7 วัน, เจาะเลือดจาก lateral tail vein ก่อนและหลังการให้สารทดสอบ. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของเม็ดเลือดขาวเป็นจำนวนร้อยละในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ, โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์.

2. การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบสารน้ำของสมุนไพรพุงทะลายและสารสกัดเปล้าตะวันในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

การทดลองนี้พัฒนาจากแบบของ (Puri *et al.* 2000) หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้, น้ำหนักระหว่าง 250±30 กรัม, จำนวน 72 ตัว, แบ่งออกเป็น 12 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว. กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับหนูภูมิคุ้มกันปกติ (immunocompetent), กลุ่ม 2 เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (immunocompromise), กลุ่ม 3 เป็นกลุ่มทดสอบสมุนไพรพุงทะลาย ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 4 เป็นกลุ่มทดสอบสมุนไพรพุงทะลาย ขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 5 เป็นกลุ่มทดสอบสมุนไพรพุงทะลายขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 6 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวันขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 7 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวัน ขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 8 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวัน ขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 9 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวัน 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับพุงทะลาย 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 10 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวัน 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับพุงทะลาย 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 11 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวัน 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับพุงทะลาย 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่มที่ 12 เป็นกลุ่มที่ได้รับ levamisole ขนาด 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

หนูทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุมสำหรับหนูภูมิคุ้มกันปกติ) จะได้รับยากดภูมิคุ้มกัน cyclophosphamide ในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าทางช่องท้อง 1 ครั้ง. หลังจากนั้น 2 วัน จึงทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกาย โดยฉีดเม็ดเลือดแดงแกะเข้าทางช่องท้องในปริมาณ $5X10^8$ เซลล์. หนูทดลองจะได้รับการป้อนสารทดสอบต่างๆ ตามกลุ่ม ภายหลังการฉีดเม็ดเลือดแดงแกะ 2 ชั่วโมง และได้รับต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน. เก็บตัวอย่างเลือดจากหางหนูทุกกลุ่มเมื่อครบ 1 และ 2 สัปดาห์, นำซีรัมที่ได้ไปหาค่าแอนติบอดีที่มีต่อเม็ดเลือดแดงแกะด้วยวิธี haemagglutination antibody test. อ่านค่าแอนติบอดีเป็น แอนติบอดีไตเตอร์, แปลงค่าแอนติบอดีไตเตอร์ที่ได้ให้อยู่ในรูป $\log_2$. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ $\log_2$ แอนติบอดีไตเตอร์ระหว่างกลุ่ม 2 (immunocompromise control) กับกลุ่มทดสอบต่างๆ ด้วยวิธีการทางสถิติแบบ oneway - analysis of variance ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์.

3. การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบพึ่งเซลล์ของสารสกัดเปล้าตะวัน ในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน การทดลองนี้ได้พัฒนาจากวิธีของ Jacysyn Abrahamsohn and Macedo (2001)

หนูถีบจักรพันธุ์ ICR เพศเมีย, น้ำหนัก 25±5 กรัม, จำนวน 43 ตัว, แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 7 ตัว ดังนี้. กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับหนูภูมิคุ้มกันปกติ (immunocompetent), กลุ่ม 2 เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (immunocompromise), กลุ่ม 3 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวัน ขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 4 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวัน ขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่ม 5 เป็นกลุ่มทดสอบสารสกัดเปล้าตะวัน ขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มที่ได้รับ levamisole ขนาด 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

หนูทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่ม 1 (immunocompetent) จะได้รับการป้อนยากดภูมิคุ้มกัน cyclosporin A ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 1 ครั้ง. หลังจากนั้น 2 วัน จึงทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายโดยฉีด ovalbumin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน complete Freund's adjuvant ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนังบริเวณโคนหาง. จากนั้น 2 ชั่วโมง จึงทำการป้อนสารทดสอบต่างๆ ตามกลุ่ม และป้อนติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน. เมื่อหนูทดลองได้รับแอนติเจน ovalbumin ครบ 1 สัปดาห์ จึงทำการทดสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันร่างกายที่มีต่อ ovalbumin, โดยทำการฉีด ovalbumin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน incomplete Freund's adjuvant ปริมาณ 25 ไมโครลิตร เข้าอุ้งเท้าซ้ายและอุ้งเท้าขวา, ฉีดสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ใน incomplete Freund's adjuvant ปริมาณ 25 ไมโครลิตร. เมื่อครบ 24 ชม, จึงวัดความหนาของอุ้งเท้าด้วย Dial thickness meter. ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการอักเสบของอุ้งเท้าซ้ายระหว่างกลุ่มทดสอบต่างๆ กับกลุ่ม 2 (immunocompromise). วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี oneway-analysis of variance ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์.

ค่าร้อยละการอักเสบของอุ้งเท้าซ้ายคำนวณได้จากสมการ ดังนี้.

ความหนาของอุ้งเท้าซ้ายที่เพิ่มขึ้น

= (ความหนาของอุ้งเท้าซ้ายหลังฉีด - ความหนาของอุ้งเท้าซ้ายก่อนฉีด)

ความหนาของอุ้งเท้าขวาที่เพิ่มขึ้น

= (ความหนาของอุ้งเท้าขวาหลังฉีด - ความหนาของอุ้งเท้าขวาก่อนฉีด)

ค่าร้อยละการอักเสบของอุ้งเท้าซ้าย

$$= \frac{\text{(ความหนาของอุ้งเท้าซ้ายที่เพิ่มขึ้น - ความหนาของอุ้งเท้าขวาที่เพิ่มขึ้น)}}{\text{ความหนาของอุ้งเท้าซ้ายก่อนฉีด}} \times 100$$

2.2.4 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

2.2.4.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เหมือน 2.2.2.1

2.2.4.2 การเตรียมสารทดสอบ

1. ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน เตรียมเป็นสารแขวนลอยใน carboxylmethycellulose 1% (CMC), เตรียมเป็นความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 7.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

2. สารละลายมาตรฐาน levamisole hydrochloride, เตรียมในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

3. Ovalbumin (OVA) เพื่อเป็นแอนติเจน, เตรียมในสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร. เมื่อจะนำมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายจึงผสมด้วย Complete Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1.

4. Cyclosporin A เพื่อเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน, เตรียมในสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ completed RPMI medium ประกอบด้วย RPMI 1640 with L-glutamine, fetal bovine serum 10 %, penicillin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, streptomycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 2- Mercaptoethanol 25 นาโนโมลาร์.

2.2.4.3 วิธีการทดลอง แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6-9 ตัว ดังนี้.

1. กลุ่ม 1 Control, หนูได้รับยา cyclosporin A (CyA), ฉีด OVA และป้อนด้วย CMC 1%.

2. กลุ่ม 2, ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 325 มิลลิกรัม/กิโลกรัม cyclosporin A (CyA), ฉีด OVA และป้อนด้วยผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 325 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

3. กลุ่ม 3, ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม/กิโลกรัม cyclosporin A (CyA), ฉีด OVA และป้อนด้วยผลิตภัณฑ์เปล้า 650 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

4. กลุ่ม 4, ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม cyclosporin A (CyA), ฉีด OVA และ ป้อนด้วยผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

5. กลุ่ม 5, levamisole 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม cyclosporin A (CyA), ฉีด OVA และ ป้อนด้วย levamisole ขนาด 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

หนูทุกตัวได้รับยากดภูมิคุ้มกันร่างกาย CyA ในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, โดยการป้อนทางปาก เป็นจำนวน 1 ครั้ง, ก่อนเริ่มการฉีดกระตุ้นด้วย OVA เป็นเวลา 2 วัน. ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายด้วย OVA ร่วมกับ complete Freund's adjuvant ในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ต่อตัว เข้าทางช่องท้อง. ภายหลังการฉีดแอนติเจนแล้ว 2 ชั่วโมง จึงทำการป้อนสารทดสอบต่างๆ ตามกลุ่ม วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องกันจนครบ 7 วัน. วันถัดมา จึงทำการเมตตาฆาตด้วยวิธี cervical dislocation แล้วเก็บแยกม้ามออกจากกายด้วยเทคนิคการปลอดเชื้อ.

ทำการแยกเซลล์ม้ามให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย cell strainer และเลี้ยงเซลล์ใน completed RPMI medium. ตรวจสอบ cell viability ด้วยเทคนิค typan blue dye exclusion. นับจำนวนเซลล์ม้ามด้วย hemocytometer. แล้วเตรียมเซลล์ม้ามที่ได้ให้มีความหนาแน่นเท่ากับ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร. นำเซลล์ม้ามของหนูแต่และตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงลงใน 24 –well cell culture cluster ที่มี OVA ผสมอยู่ในความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร. บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง. เมื่อครบเวลา จึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant) ไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส.

ทำการวัดปริมาณไซโทไคน์ IL-2 ใน supernatant ด้วยวิธี sandwich enzyme immunoassay (OptEIA® ELISA set). วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader (genios plus) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร.

2.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

ก่อนทำการทดสอบ, นำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ, ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส. จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายและทำสัญลักษณ์ประจำตัว โดยการแต้มเบอร์ที่หาง. อดอาหารหนู 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ, โดยให้น้ำดื่มตามปกติ.

เตรียมสารทดสอบและสารมาตรฐาน phenylbutazone ในสารแขวนลอยพื้นฐาน (carboxyl methylcellulose 1%) และเตรียม carrageenan ในรูปสารละลาย, ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและบวมที่อุ้งเท้าหนู, โดยละลายใน 0.9 เปอร์เซ็นต์ น้ำเกลือ, จนได้ขนาดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร.

ในวันทดสอบ, วัดปริมาตรอุ้งเท้าข้างซ้ายของหนูทุกตัว ด้วยเครื่อง Plethysmometer บันทึกผลไว้. หลังจากนั้น ป้อนสารทดสอบทางปากให้หนูแต่ละกลุ่ม ดังนี้. กลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในขนาดต่างๆ ที่ 325, 650 และ 1300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว, กลุ่มควบคุมบวก ได้รับสารแขวนลอยมาตรฐาน phenylbutazone ขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และกลุ่มควบคุมได้รับสารแขวนลอยพื้นฐานปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดลอง. เมื่อครบ 1 ชั่วโมง หลังจากป้อนสารทดสอบ, ให้ฉีดสารละลาย 1% carrageenan เข้าใต้ผิวหนังอุ้งเท้าซ้ายของหนูทุกกลุ่ม ในขนาด 0.1 มิลลิลิตร. หลังจากนั้น วัดความเปลี่ยนแปลงของปริมาตรอุ้งเท้าหนูที่ชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3.

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, เพื่อดูผลของตัวอย่างทดสอบต่อการบวมของอุ้งเท้า.

2.2.6 การทดสอบฤทธิ์ลดไข้ของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

การทดสอบพัฒนาตามแบบของ Vogel (2002) และ Kido *et al.* (1998). ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส. จัดกลุ่มหนู โดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายและทำสัญลักษณ์ประจำตัว โดยการแต้มเบอร์ที่หาง. อดอาหารหนู 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ.

เตรียมสารทดสอบและสารมาตรฐาน diclofenac ในสารแขวนลอยพื้นฐาน (carboxyl methylcellulose 1%) และเตรียม brewer yeast โดยละลายใน 0.9 เปอร์เซ็นต์ น้ำเกลือ ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร.

ทำการวัดอุณหภูมิเริ่มต้นของหนูทุกตัว โดยสอดเครื่องตรวจวัดอุณหภูมิเข้าทางทวารหนักให้ลึก 4 เซนติเมตร. หลังจากนั้น จึงฉีด brewer yeast ในปริมาณ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าในชั้นใต้ผิวหนัง. ภายหลังการฉีด ให้ทำการอดอาหารหนูทันที. พักหนูไว้ 18 ชั่วโมง จึงทำการวัดอุณหภูมิทางทวารหนักอีกครั้ง. หนูที่มีอุณหภูมิร่างกายเพิ่มมากกว่า 0.5 องศาเซลเซียส จะนำมาใช้ในการทดสอบต่อไป. โดยจัดแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้, กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ป้อน CMC 1% ในปริมาณเทียบเท่ากับหนูกลุ่มอื่นๆ, กลุ่มที่ 2 ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 325 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่มที่ 3 ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, กลุ่มที่ 4 ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และกลุ่มที่ 5 ได้รับสารมาตรฐาน diclofenac 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม. หลังจากป้อนสารทดสอบต่างๆ ตามกลุ่มแล้ว 1

ชั่วโมง, จึงทำการวัดอุณหภูมิทุกๆ ชั่วโมง จนครบ 3 ชั่วโมง. คำนวณค่าร้อยละของการลดไข้ในหนูแต่ละตัวตามสมการ ดังนี้.

ค่าร้อยละการลดไข้ = 1-(A-D) x 100/A

A = อุณหภูมิหลังฉีด brewer yeast 18 ชั่วโมง – อุณหภูมิเริ่มต้น

D = อุณหภูมิหลังป้อนสารทดสอบชั่วโมงที่ 1-3 - อุณหภูมิหลังฉีด brewer yeast 18 ชั่วโมง

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Independent T test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, เพื่อดูผลของตัวอย่างต่อการยับยั้งการเกิดไข้.

2.2.7 การทดสอบฤทธิ์คลายกังวลของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

2.2.7.1 การเตรียมสารสำหรับทดสอบ

1. ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน, เตรียมให้อยู่ในรูปสารแขวนลอย ในสารสะลาย 20% acacia (น้ำหนัก/ปริมาตร).

2. สารมาตรฐาน phenobarbital, เตรียมให้อยู่ในรูปสารแขวนลอย ในสารสะลาย 20% acacia (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ขนาดความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

3. สารละลาย corticosterone, ในขนาดความเข้มข้น 35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน 0.3% ethanol (ปริมาตร/ปริมาตร). โดยเตรียมเป็นน้ำดื่มสำหรับหนูทดลองในขนาด 13 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน, เพื่อเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดความวิตกกังวลในหนูทดลอง (Ardayfio and Kim 2006).

2.2.7.2 สัตว์ทดลอง

นำหนูทดลองมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดสอบนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม.

2.2.7.3 Light/dark chamber

เป็นกล่องอะคริลิกใสขนาด 20x60x35 เซนติเมตร, ด้านบนของกล่องมีช่องระบายอากาศ และช่องเปิดสำหรับใส่หนูทดลอง, กึ่งกลางแบ่งเป็น 2 ฝั่ง ด้วยแผ่นพลาสติกสีดำทึบแสง, มีช่องเล็กที่หนูทดลองสามารถผ่านเข้าออกระหว่าง 2 ฝั่งได้. ด้านนอกของกล่องครอบด้วยแผ่นพลาสติกสีดำ ทึบแสง. ที่ผนังด้านในเหนือพื้นกล่องประมาณ 2 เซนติเมตร ของทั้ง 2 ฝั่ง ติด sensor ตัดแสง. ด้านฝั่งสว่างมีหลอดไฟสีขาวขนาด 9 วัตต์ ติดอยู่ด้านบน ที่ผนังทั้ง 4 ด้าน (รวมพื้น), ปิดทับด้วยกระดาษสีขาวทึบแสง.

2.2.7.4 การทดสอบฤทธิ์คลายกังวลของสารทดสอบ

ประยุกต์ใช้วิธีการของ Ardayfio and Kim (2006) และ Krishna *et al*. (2006), โดยทำการทดลองสำหรับทุกสารทดสอบเหมือนกัน ดังนี้.

1. แบ่งหนูทดลองเป็น 5 กลุ่ม, จัดหนูแต่ละกลุ่มให้อยู่กรงเดียวกัน กลุ่มละ 6 ตัว, ชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลองวันเริ่มการทดลอง.

2. ให้สารละลาย corticosterone ในน้ำดื่มสำหรับหนูทดลองในขนาด 13 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 16 วัน. ในระหว่างนี้ ชั่งน้ำหนักหนูในวันที่ 8 และ 17 ของการทดลอง.

3. ในวันที่ 17 ของการทดลอง, หนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม แบ่งตามสารทดสอบที่ได้รับ ได้แก่ กลุ่มควบคุม (สารสะลาย 20% acacia (น้ำหนัก/ปริมาตร)), กลุ่มสารมาตรฐาน, กลุ่มสารทดสอบที่ความเข้มข้นขนาด 325 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว, กลุ่มสารสกัดที่ความขนาด 650 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และกลุ่มสารสกัดที่ความขนาด 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว.

4. หลังป้อนสารทดสอบ 1 ชั่วโมง, นำหนูเข้าทดสอบ light/dark task. โดยนำหนูทดลองแต่ละตัววางใน light/dark chamber ที่ฝั่งด้านมืดในสุด, แล้วสังเกตและจดบันทึกพฤติกรรมความวิตกกังวลของหนูทดลองเป็นเวลา 10 นาที.

พฤติกรรมความวิตกกังวลของหนูทดลองใน light/dark task

โดยปกติ หนูจะมีนิสัยชอบอยู่ในที่มืดและแคบ, กลัวที่โล่งและสว่าง. หากมีการเปลี่ยนที่ หนูจะมีการสำรวจสถานที่ใหม่. แต่หากหนูกลัวสถานที่นั้นๆ หนูจะไม่กล้าเดินสำรวจและมักจะอยู่นิ่งกับที่, หากมีความวิตกกังวลหรือเกิดความเครียด. ดังนั้น เมื่อให้สารทดสอบต่างๆ แก่หนูที่ได้รับสารละลาย corticosterone ในน้ำดื่มเป็นเวลา 16 วันแล้ว, หลังให้สารทดสอบ 1 ชั่วโมง, สังเกตและจดบันทึกพฤติกรรมใน light/dark chamber เป็นเวลา 10 นาที, ดังนี้.

1. จำนวนครั้งของการเดินเข้าไปในฝั่งมืดและสว่าง (number of entries in chamber), โดยจะนับว่า หนูทดลองได้เดินเข้าไปในฝั่งนั้นๆ เมื่อเท้าทั้ง 4 ได้เดินเข้าไปทั้งหมด. จำนวนครั้งของการเดินที่มากกว่า แสดงให้เห็นว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อยกว่าจำนวนครั้งที่น้อยกว่า.

2. จำนวนครั้งของการยืนด้วยเท้าหลังในฝั่งมืดและสว่าง (number of rear in chamber). จำนวนครั้งของการยืนด้วยเท้าหลัง หมายถึง หนูทดลองมีการสำรวจสถานที่นั้นๆ. ดังนั้น จำนวนครั้งของการยืนด้วยเท้าหลังที่มากกว่า แสดงให้เห็นว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อยกว่าจำนวนครั้งที่น้อยกว่า. จำนวนครั้งของการเดินตัดแสง sensor ในฝั่งมืดและสว่าง (number of locomotor activities), จำนวนครั้งของการเดินตัดแสง sensor หมายถึง หนูทดลองมีเดิน/เคลื่อนไหวในฝั่งนั้นๆ. ดังนั้น จำนวนครั้งของ

การเดินตัดแสง sensor ที่มากกว่า แสดงให้เห็นว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อยกว่าจำนวนครั้งที่น้อยกว่า.

3. เวลาที่ใช้ทั้งสิ้นในฝั่งสว่าง (time spent in light chamber, sec), หากหนูทดลองใช้เวลาในฝั่งสว่างมาก แสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อย. พฤติกรรมนี้เป็นตัวแปรสำคัญในการพิจารณาพฤติกรรมความวิตกกังวลในหนูทดลอง.

4. เวลาที่ใช้ก่อนเข้าไปในฝั่งสว่าง (latency to enter the light chamber, sec), หากหนูทดลองใช้เวลาก่อนเข้าไปในฝั่งสว่างน้อย แสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อย. ในทางตรงกันข้าม หากหนูทดลองใช้เวลานานในการเปลี่ยนจากฝั่งมืดเป็นฝั่งสว่าง แสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลสูง. พฤติกรรมนี้เป็นตัวแปรสำคัญในการพิจารณาพฤติกรรมความวิตกกังวลในหนูทดลอง.

สถิติที่ใช้ในการทดสอบ ผลการทดลองที่ได้ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความผิดพลาดของค่าเฉลี่ย (s.e.m.) และคำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยใช้ One-way ANOVA และ student's t-test, $p < 0.05$.

2.2.8 การทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันต่อเซลล์ชนิด HepG2; a human liver hepatocarcinoma cell line

2.2.8.1 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง : HepG2

อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง minimum essential medium (MEM) ร่วมกับ 10% fetal bovine serum, 0.1 มิลลิโมลาร์ MEM non-essential amino acid, 1.0 มิลลิโมลาร์ sodium pyruvate, 2 มิลลิโมลาร์ L-glutamine และ 100 ยูนิต/มิลลิลิตร penicillin และ streptomycin, บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2.

โดยทำการเตรียมเซลล์ตับ (HepG2) มาเพาะเลี้ยงใน 96 well plate, โดยมีความหนาแน่น 5,000 cells/well, นำไปเพาะเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, จนเซลล์เป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) หรืออย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์.

2.2.8.2 การเตรียมสารทดสอบ

นำผลิตภัณฑ์ทดสอบมาละลายใน 100% DMSO เพื่อทำ stock solution ความเข้มข้นสูงสุด 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร. นำสารละลายที่ได้มากรองด้วย 0.2 ไมโครเมตร filter และเจือจางสารทดสอบ

ดังกล่าวให้มีความเข้มข้นต่างๆ 8 ความเข้มข้น ดังนี้ 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078 และ 0.039 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.

2.2.8.3 การทดสอบ

เมื่อครบ 48 ชั่วโมง หรือเมื่อพบว่า เซลล์ที่บ่มเพาะไว้เป็นลักษณะชั้นเดี่ยว (monolayer) หรือเติบโตอย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์, ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและแทนที่สารทดสอบที่ความเข้มข้นที่ได้เตรียมมาก่อน ลงไปสัมผัสกับเซลล์เพาะเลี้ยงหลุมละ 200 ไมโครลิตร. นำไปบ่มเพาะอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง. ภายหลังครบเวลา, ทำการดูดสารทดสอบออกและแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่จำนวนหลุมละ 200 ไมโครลิตร และนำไปบ่มเพาะอีกครั้งใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง. เมื่อครบเวลาเติม 50 ไมโครลิตร MTT ที่ละลายใน PBS ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในแต่ละหลุม และบ่มเพาะอีกครั้งในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง. เมื่อครบเวลาดังกล่าวดูด MTT และอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง. ทำการเติม 100 ไมโครลิตร DMSO เพื่อไปละลายผลึกที่เกิดขึ้น. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร, นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับกลุ่มควบคุม.

2.2.9 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

ดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันดัดแปลงวิธีทดสอบ OECD (2001)

2.2.9.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูทดลอง 40 ตัว, เป็นเพศผู้และเพศเมียเพศละ 20 ตัว. ก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์, นำหนูทดลองมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50-70 เปอร์เซ็นต์, เพื่อให้หนูทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ. ก่อนวันทดสอบ, แบ่งกลุ่มหนูทดลอง โดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดสอบจำนวน 3 กลุ่ม. แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้และเพศเมียเพศละ 5 ตัว. หนูทดลองแต่ละตัวได้รับการทำสัญลักษณ์ประจำตัว โดยการแต้มเบอร์ที่หาง และอดอาหารหนูทดลอง 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ แต่ให้น้ำดื่มตามปกติ.

2.2.9.2 การเตรียมตัวอย่างทดสอบและวิธีทดสอบ

ในวันทดสอบ ชั่งน้ำหนักหนูทดลองทุกตัว. ป้อนตัวอย่างทดสอบทางปากให้หนูกลุ่มทดสอบทั้ง 3 กลุ่ม ในขนาด 2,000, 5,000 และ 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และป้อนน้ำกลั่นแก่หนูกลุ่ม

ควบคุม ด้วยปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ. ภายหลังป้อนตัวอย่างทดสอบครบ 4 ชั่วโมง, ให้อาหารแก่หนูทดลองทุกกลุ่ม.

2.2.9.3 การสังเกตผลการทดสอบ

เหมือน 2.2.1.3.

2.2.9.4 การคำนวณ Lethal Dose 50 (LD_{50})

การหาค่า LD_{50} ดัดแปลงวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949) โดยนำเปอร์เซ็นต์สัตว์ทดลองที่ตายในแต่ละกลุ่ม มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลอง (บนแกน Y) กับขนาดของตัวอย่างทดสอบที่ให้แก่สัตว์ทดลองในค่า Log (บนแกน X) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel.

2.2.10 การทดสอบผลของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ที่มีต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว

ใช้หนูจำนวน 30 ตัว เป็นเพศผู้และเพศเมียเพศละ 15 ตัว. ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 1 สัปดาห์, เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส. จัดกลุ่มหนูเป็น 3 กลุ่มทดสอบ ใช้หนูเพศละ 5 ตัว, โดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย และทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง. อดอาหารหนู 16 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ.

หนูในกลุ่มทดสอบ ได้รับการป้อนผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันทางปากในขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว. สำหรับหนูในกลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่นทางปากในปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ และสาร cyclophosphamide ขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว, โดยฉีดเข้าทางช่องท้องตามลำดับ.

24 ชั่วโมง หลังจากป้อนผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน, หนูทุกตัวจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบ โดยการให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเก็บเซลล์ไขกระดูกจากกระดูกต้นขา เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์โครโมโซม, ประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์โดยเปรียบเทียบค่า % mitotic index และเปรียบเทียบความเสียหายของโครโมโซมระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม. โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, เพื่อดูผลของตัวอย่างทดสอบต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนู.

2.2.11 การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน

ศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังทางปากตาม OECD (1998) ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัวต่อกลุ่ม, เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว, โดยนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนทำการทดสอบนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส.

ก่อนวันป้อนตัวอย่างทดสอบ 1 วัน, อดอาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อน โดยให้น้ำดื่มตามปกติ. ชั่งน้ำหนักตัวหนูและทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง. ทำการเก็บปัสสาวะ เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมี (chemical urine analysis). เก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่หาง เพื่อศึกษาทางโลหิตวิทยาและศึกษาทางด้านเคมีคลินิก. ในวันที่ป้อนตัวอย่างทดสอบ เตรียมผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันในรูปแบบสารแขวนลอยให้ได้ความเข้มข้น 10, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในน้ำกลั่น และป้อนสารทดสอบทางปากในขนาด 100, 500 และ 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว, ตามลำดับ. ป้อนน้ำกลั่นให้หนูในกลุ่มควบคุมด้วยปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ. สำหรับในกลุ่ม Satellite จะได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันขนาด 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 90 วัน. จากนั้น หยุดป้อนตัวอย่างทดสอบและสังเกตอาการต่อไปอีกเป็นเวลา 30 วัน เพื่อศึกษาอาการกลับเป็นปกติ. หากมีอาการข้างเคียงหลังป้อนตัวอย่างทดสอบ, ทำการสังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูอย่างน้อยวันละครั้งทุกวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน และชั่งน้ำหนักตัวหนูทุกๆ 7 วัน จนครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite. เปรียบเทียบอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูและอัตราการกินอาหารระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม, โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี student' s t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์.

หนูที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน ให้หนูอดอาหาร แต่ให้ดื่มน้ำตามปกติเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนทำการเก็บปัสสาวะ เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมี (chemical urine analysis), เก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่หาง เพื่อศึกษาทางโลหิตวิทยา ได้แก่ red blood cell (RBC), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), hemoglobin (Hgb), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet และ white blood cell (WBC). หลังจากนั้น หนูทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบ โดยการให้สูดดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์. ทำการเปิดหน้าท้องและเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำใหญ่ในช่องท้อง (abdominal vein), นำมาปั่นแยกเอาซีรัม เพื่อศึกษาทางด้านเคมีคลินิก ได้แก่ วิเคราะห์หา albumin, alkaline phosphatase (ALP), alanine transminase (ALT), aspartate transaminase (AST), calcium,

chloride, cholesterol, creatinine, gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), glucose, phosphorus, potassium, sodium, total bilirubin, total protein, triglyceride และ urea nitrogen. หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดเรียบร้อยแล้ว จะทำการตรวจดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathological examination). ชั่งน้ำหนักและทำการเก็บอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง, ต่อมไทมัส, ปอด, หัวใจ, ตับ, ไต, ต่อมหมวกไต, กระเพาะอาหาร, ลำไส้เล็ก, ลำไส้ใหญ่, อัณฑะ, รังไข่ และมดลูก. โดยนำอวัยวะภายในของสัตว์ทดลองทั้งหมดมาทำการตรึงสภาพ (fix) ใน 10% buffer formalin เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยย้อมสี hematoxylin และ eosin แล้วให้พยาธิแพทย์ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป.

2.2.12 การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

2.2.12.1 ด้านเคมี

2.2.12.1.1 การทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) จากสารสกัดเปล้าตะวัน

1. ชั่งสารสกัดเปล้าตะวัน 0.5000 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร.

2. ละลายด้วย hexane 2 มิลลิลิตร, นำไป Sonicate 15 นาที, ปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วย hexane.

3. เตรียมสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น 200, 300, 400, 500 และ 600 พีพีเอ็ม โดยปิเปตต์สารจากข้อ 2. มา 1 , 1.5 , 2 , 2.5 และ 3 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย hexane.

4. กรองด้วย fillter PTFE membrane, แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ที่มีอัตราส่วนของ mobile phase ตามตารางที่ 1 จำนวน 10 ไมโครลิตร.

ตารางที่ 1. อัตราส่วน Mobile phase

Time	Flow (มล./นาที)	%A	%B
-	1	100	0
5	1	100	0
15	1	80	20
20	1	80	20
25	1	100	0
30	1	100	0

2.2.12.1.2 การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ทำการเก็บผลิตภัณฑ์ใน 3 อุณหภูมิ คือ ที่อุณหภูมิห้อง 35 และ 45 องศาเซลเซียส แล้วสุ่มตรวจทุก 1 เดือนเป็นเวลา 6 เดือน, โดยนำมาวิเคราะห์ปริมาณ marker เปรียบเทียบกับปริมาณที่ T0 ตามวิธี ดังนี้.

1. ชั่งแกรนูลเปล้าตะวันประมาณ 0.1284 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร.

2. เติม hexane จำนวน 2 มิลลิลิตร, นำไป sonicate 15 นาที, ปรับปริมาตรด้วย Hexane.

3. ปิเปตต์สารละลายจากข้อ 2 มา 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวด volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร, แล้วปรับปริมาตรด้วย hexane HPLC grade.

4. กรองด้วย filter PTFE, แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC 10 ไมโครลิตร 3 ซ้ำ.

2.2.12.2 ด้านจุลชีววิทยา

ทำการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันด้วยวิธี Microbial Limit Test ตามมาตรฐาน กระทรวงสาธารณสุข (2538) ในทุกล็อตที่ทำการผลิต.

2.2.13 การทดสอบทางคลินิกระยะที่หนึ่งในมนุษย์ (อยู่สบาย และสุโนภักดิ์ 2555)

1. การคัดเลือกอาสาสมัคร

การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย. มีการประชาสัมพันธ์ โดยการติดป้ายประกาศรับสมัครอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการบริเวณคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต). ข้อความที่อยู่ในใบประกาศได้ผ่านการพิจาณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว, โดยได้อธิบายการเข้าร่วมโครงการวิจัยให้อาสาสมัครเข้าใจและตัดสินใจว่า จะเข้าร่วมโครงการหรือไม่. มีการพิจารณาตามเกณฑ์ ดังต่อไปนี้.

จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่จะศึกษาทั้งสิ้น 20 คน, โดยแบ่งเป็น เพศชาย 10 คน อายุ 20–45 ปี และเพศหญิง 10 คน อายุ 20–45 ปี.

เกณฑ์การรับอาสาสมัครเข้าโครงการ (inclusion criteria)

1. เพศชายและเพศหญิง, ถ้าเป็นหญิง ต้องไม่ตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร (อาสาสมัครหญิงวัยเจริญพันธ์ที่ยังมีเพศสัมพันธ์ ต้องไม่ตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร, มีการคุมกำเนิดที่ปลอดภัยและน่าเชื่อถือได้ ตั้งแต่หลังมีประจำเดือนครั้งสุดท้ายก่อนเข้าโครงการไปจนสิ้นสุดโครงการอย่างน้อย 2 สัปดาห์).

2. อายุ 20–45 ปี.
3. มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง.
4. ไม่มีโรคประจำตัวที่ต้องให้การรักษาด้วยการแพทย์แผนปัจจุบัน.
5. สมัครใจเข้าร่วมโครงการและปฏิบัติตามคำแนะนำ.
6. ไม่สูบบุหรี่, ไม่ดื่มสุราหรือกินวิตามินและอาหารเสริมใดๆ.
7. ยินดีปฏิบัติตามคำแนะนำระหว่างที่ทำการศึกษา เป็นเวลา 1 เดือน.
8. ไม่อยู่ในระหว่างโครงการวิจัยอื่น.
9. ไม่แพ้ยาสมุนไพร.

เกณฑ์การไม่รับอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (exclusion criteria)

1. รับประทานยาหรือสมุนไพร อย่างใดอย่างหนึ่ง.

เกณฑ์การออกจากโครงการ (discontinuation criteria)

1. ไม่มาตามนัด.
2. มีอาการแพ้ยา.
3. เมื่อผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแสดงแนวโน้มผิดปกติอันอาจเป็นอันตราย.
4. อาสาสมัครต้องการออกจากโครงการ.
5. ไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำจนอาจมีผลต่อการศึกษาวิจัย.

การยุติทั้งโครงการ (stopping rules)

1. เจ็บป่วยจนต้องกินยาอย่างใดอย่างหนึ่งระหว่างที่ทำการศึกษาเปล้าตะวัน.
2. มีการเสียชีวิตอันเชื่อว่าเกิดจากสารสกัดเปล้าตะวัน.

2. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

2.1 การคัดกรองอาสาสมัครมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

อาสาสมัครที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับข้อการอธิบายโครงการวิจัยและได้อ่านรายละเอียดโครงการวิจัยในเอกสารข้อมูล เพื่อการตัดสินใจ (information sheet) และอาสาสมัครเป็นคนตัดสินใจว่า จะเข้าร่วมโครงการวิจัยหรือไม่. การให้ข้อมูลเพื่อการตัดสินใจนั้น มีรายละเอียดครอบคลุมโดยละเอียดตั้งแต่ชื่อโครงการวิจัย, วัตถุประสงค์การวิจัย, ความเสี่ยง, ความไม่สะดวกสบายที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างเข้าร่วมโครงการ, การเก็บรักษาความลับของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ, รวมทั้งประโยชน์ของอาสาสมัครที่จะได้รับระหว่างเข้าร่วมโครงการวิจัย เป็นต้น.

2.2 การลงนามในใบยินยอม

การลงนามใบยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร, กรณีอาสาสมัครหรือผู้แทนโดยชอบไม่สามารถอ่านหนังสือได้ ควรมีพยานที่ไม่มีส่วนได้ส่วนเสียอยู่ด้วยตลอดที่มีการให้ข้อมูล, ควรลงนามและลงวันที่ด้วยตนเอง.

2.3 การซักประวัติ ตรวจร่างกาย

ซักประวัติอาการปัจจุบัน เช่น คลื่นไส้, อาเจียน, วิงเวียน, ท้องอืด, ท้องเฟ้อ, ผื่น, ใจสั่น, เหนื่อยหอบ, ประวัติการเจ็บป่วยในอดีต, ประวัติส่วนตัว, ประวัติการใช้ยา. อาสาสมัครผู้หญิงซักประวัติประจำเดือน, การตรวจร่างกายสัญญาณชีพ, การตรวจร่างกายตามระบบ, การตรวจทางห้องปฏิบัติการ. อาสาสมัครได้รับคำแนะนำการเตรียมตัวก่อนเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะ. ข้อมูลการคัดกรองอาสาสมัครประกอบด้วยข้อมูลสำคัญ ได้แก่ เพศ, อายุ, อาชีพ, ดัชนีมวลกาย, สัญญาณชีพ(vital sign), อาการ, อาการแสดง, การซักประวัติ, ตรวจร่างกาย. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย HIV, VDRL, G-6-PD, Blood gr., Film chest, EKG, CBC, UA, FBS, LFT, RFT, Lipid profile,CD4, CD4:CD8 ratio.

อาสาสมัครที่ผ่านการคัดกรองพิจารณาจากผลการซักประวัติ, มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง, ไม่มีประวัติการเจ็บป่วยร้ายแรง, ผลการตรวจร่างกายทั่วไปและการตรวจร่างกายตามระบบ ไม่พบอาการแสดง (sign) ผิดปกติ โดยพิจารณาร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ.

2.4 การให้ยา

หลังจากผ่านคัดกรอง D_0 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว, อาสาสมัครจะได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันแคปซูลละ 650 มิลลิกรัม, รับประทานครั้งละ 1 แคปซูล, ให้รับประทานก่อนอาหารเช้า 30 นาที และก่อนอาหารเย็น 30 นาที เป็นเวลา 28 วัน และหลังจากนั้น จะหยุดยาและนัดมาตรวจหลังจากนั้นอีก 1 สัปดาห์ คือ วันที่ 35, โดยมีการซักประวัติ, การตรวจร่างกาย และดูผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ.

2.5 การจัดกลุ่มอาสาสมัคร อาสาสมัครมีจำนวนทั้งสิ้น 20 คน.
โดยแยกเป็นเพศชาย จำนวน 10 คน, เพศหญิง จำนวน 10 คน.

2.6 การติดตามอาสาสมัคร

การติดตามหลังการได้รับยา (After), โดยการติดตามใน D_7 (ครบ 7 วัน), D_{14} (ครบ 14 วัน), D_{21} (ครบ 21 วัน), D_{28} (ครบ 28 วัน). หลังจากนั้น หยุดรับประทานยาและนัดติดตามอาสาสมัครเมื่อครบ 7 วันหลังหยุดยา (D_{35}). บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึกอาสาสมัคร (case record form).

2.7 การควบคุมการวิจัย

การซักประวัติ, ตรวจร่างกาย, อาการไม่พึงประสงค์ และการตรวจร่างกาย มีรายละเอียดการติดตามหลังได้รับยาตามแบบบันทึกอาสาสมัคร (case record form) โดยแพทย์แผนปัจจุบัน.

3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.1 การเตรียมตัวอาสาสมัคร อาสาสมัครที่ผ่านการคัดกรองได้รับคำแนะนำในการเตรียมตัว ได้แก่ การงดน้ำและอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมง, แนะนำไม่สูบบุหรี่, ไม่ดื่มสุราหรือรับประทานยาอย่างใดอย่างหนึ่ง, รวมทั้งกินวิตามินและอาหารเสริมอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนตรวจเลือดและปัสสาวะ.

3.2 การเก็บสิ่งส่งตรวจ (specimen collection)

การเก็บปัสสาวะ ให้เก็บปัสสาวะส่วนกลาง (mid stream urine) ตามปริมาณที่ระบุ, โดยมีขั้นตอนดังนี้,

- ทำความสะอาดบริเวณอวัยวะขับถ่ายภายนอก.
- ถ่ายปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อน, แล้วเก็บปัสสาวะช่วงกลางให้ได้ปริมาตรได้น้อยกว่า 10 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะที่จัดเตรียมให้ ซึ่งมีรหัสข้อมูลอาสาสมัคร.
- ถ่ายปัสสาวะช่วงท้ายทิ้งไปจนเสร็จ.
- ปิดฝาภาชนะให้สนิท.

การเจาะเลือด ใช้วิธีการเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำ (venous puncture) โดยมิให้เส้นเลือดที่เจาะเกิดการแตก ทำให้เลือดรั่วไหลคั่งบริเวณใต้ผิวหนัง จนมีอาการบวมเขียวคล้ำ, ใส่ภาชนะเป็นหลอดแบบระบบสุญญากาศ (vacuum tube) ซึ่งดำเนินการโดยผู้ที่มีความชำนาญในการเจาะเลือด.

3.3 การส่งสิ่งตรวจ ควรปิดฝาหลอดตัวอย่างให้แน่น, นำส่งหลอดตัวอย่างใส่ในภาชนะที่มิดชิด. กรณีที่หลอดเก็บตัวอย่างนั้นสามารถแตกได้ง่าย ควรมีกันกระแทกใส่มาในภาชนะด้วย. การส่งหลอดตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง (25–30 องศาเซลเซียส) ควรกระทำภายใน 30 นาที, ถ้าระยะเวลานานกว่านั้น ให้นำส่งที่ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการแช่ด้วยน้ำแข็ง.

การติดป้ายหลอดตัวอย่างอาสาสมัคร

1. ระบุรหัสและวันที่เจาะเก็บเลือดให้ชัดเจน.

2. ปิดสติกเกอร์เป็นแนวตรง ไม่ม้วนเกลียวรอบหลอดเก็บเลือด. เมื่อปิดสติกเกอร์ แล้วยังมองเห็นแถบสีที่บอกชนิดของหลอดเก็บเลือดและเว้นช่องว่างให้เห็นขีดบอกระดับเลือดที่ต้องเจาะและระดับเลือดที่ใส่ลงมาในหลอด.

4. การเตรียมยาและตรวจสอบคุณภาพ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จะเป็นผู้ผลิตผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน พร้อมทั้งควบคุมคุณภาพ, โดยทำเป็นรูปแบบแคปซูลๆ ละ 650 มิลลิกรัม, ซึ่งมีส่วนผสมของ สารสกัดเปล้าตะวัน, พุงทะลาย และแล็กโทส.

สารสกัดเปล้าตะวันที่ใช้ในการวิจัย จะใช้เปล้าตะวันเก็บจากแหล่งเดียว คือ ที่จังหวัดจันทบุรี และทำการสกัดด้วยเอทานอล, โดยจะทำการสกัดด้วยอัตราส่วนเปล้าตะวัน : เอทานอล = 1: 20, แล้วระเหยตัวทำละลายให้แห้ง ภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ. ในการทดสอบฤทธิ์ตลอดการวิจัย จะใช้สารสกัดที่ผลิตล็อตเดียวกัน.

จากการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, นำมาคำนวณค่า Human Equivalent Dose และ The maximum recommended starting dose ได้ขนาดรับประทาน 300 มิลลิกรัม/น้ำหนักมนุษย์ 60 กิโลกรัม/วัน. ในการผลิตเป็นแคปซูล, ปริมาณสารสกัดที่สามารถใส่ได้สูงสุดในการทำเป็นแกรนูลร่วมกับแล็กโทส คือ สารสกัดเปล้าตะวัน ปริมาณ 150 มิลลิกรัม และแล็กโทส ปริมาณ 500 มิลลิกรัม, รวมทั้งสิ้น 650 มิลลิกรัม ใน 1 แคปซูล. ดังนั้น จึงกำหนดให้รับประทานวันละ 2 แคปซูล.

5. การพิจารณาด้านจริยธรรม

เสนอคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เพื่อพิจารณา และได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ MTU-TM-4-CR095-095/53, ลงวันที่ 17 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554.

6. **การวิเคราะห์ข้อมูล**

1. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์, ซึ่งมีสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลประกอบด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ความถี่, ร้อยละ. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย HIV, VDRL, G-6-PD, blood gr., film chest, EKG.

2. สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) ใช้พาราเมตริก Repeated ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยก่อน–หลังทดลอง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ CBC, UA, LFT, RFT, lipid profile,CD4, CD4:CD8 ratio.

3. ผลการทดลอง และวิจารณ์

3.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของสารสกัดเปล้าตะวัน

อาการผิดปกติ ภายหลังจากป้อนตัวอย่างทดสอบที่ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ให้หนูทดลอง พบว่า หนูทุกตัวแสดงอาการปกติ, ไม่พบการตาย, แต่พบอาการซึม, ขนฟู และถ่ายเหลวของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับตัวอย่างทดสอบขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว, ซึ่งอาการดังกล่าวข้างต้นหายไปภายใน 3 วัน. ผลการชั่งน้ำหนักในวันที่ 8 และวันที่ 15 พบว่า ค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูในกลุ่มที่ได้รับตัวอย่างทดสอบมีค่าไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม, แต่พบว่า หนูเพศผู้ในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักเป็นไปอย่างช้าๆ ในสัปดาห์แรกของการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2. หนูทุกตัวมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาสังเกตผลนาน 14 วัน และตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในจากการชันสูตรซากเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ.

ตารางที่ 2. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม

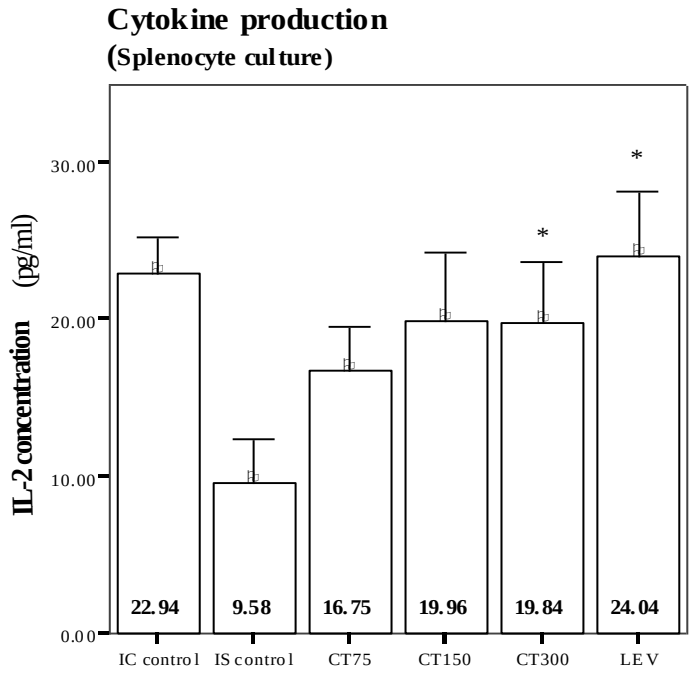
เพศ	ตัวอย่างทดสอบ/ขนาด	*ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	
		วันที่ 8	วันที่ 15
ผู้	**กลุ่มควบคุม** (2% tragacath : น้ำมันมะกอก) ปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	58.20 ± 4.37	80.60 ± 6.27
	กลุ่มทดสอบ สารสกัดเปล้าตะวัน 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	61.20 ± 2.31	86.80 ± 3.83
	กลุ่มทดสอบ สารสกัดเปล้าตะวัน 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	**45.80 ± 1.96	72.20 ± 2.31
เมีย	**กลุ่มควบคุม** (2% Tragacath : น้ำมันมะกอก) ปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	29.40 ± 3.04	43.40 ± 3.02
	กลุ่มทดสอบ สารสกัดเปล้าตะวัน 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	34.60 ± 5.54	42.40 ± 4.38
	กลุ่มทดสอบ สารสกัดเปล้าตะวัน 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	27.00 ± 3.20	38.60 ± 4.50

หมายเหตุ: *น้ำหนักหนูทดลองที่เพิ่มขึ้น Mean ± SEM

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

จากขั้นตอนการเตรียมเซลล์ม้าม พบว่า เซลล์ม้ามมีอัตราการมีชีวิต (cell viability) มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์. การกระตุ้นเซลล์ม้ามด้วย ovalbumin ในหนูกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันปกติ (IC control) จะแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ IL-2 เท่ากับ 22.94±2.37 พิโกกรัม/มิลลิลิตร. แต่เมื่อหนูได้รับการกดภูมิคุ้มกันด้วย Cyclosporin A (IS control), เซลล์ม้ามจะมีการสร้าง IL-2 น้อยลงเหลือเท่ากับ 9.58±2.81 พิโกกรัม/มิลลิลิตร. การป้อนสารสกัดเปล้าตะวันที่ระดับต่างๆ สามารถช่วยเพิ่มปริมาณของ IL-2 ได้, โดยเฉพาะที่ระดับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 19.84 พิโกกรัม/มิลลิลิตร. จากการคำนวณทางสถิติแบบ student's t-test พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม IS control. สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารมาตรฐาน levamisole ในขนาด 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีการสร้าง IL-2 เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน.



รูปที่ 1. การสร้างไซโทไคน์จากเซลล์ม้าม.

กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ IL-2 (พิโกกรัม/มิลลิลิตร.) พร้อมด้วย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย.

วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี student's t-test เครื่องหมาย * แสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม IS control

IC control = immunocompetent control

IS control = immunosuppressive control

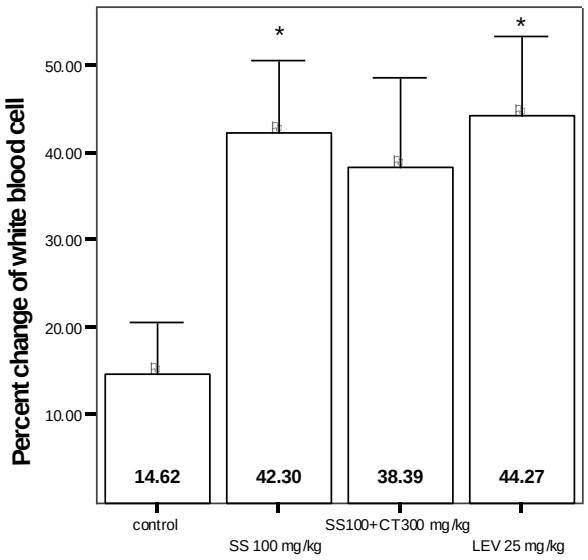
CT = *Croton thorelii*, LEV = levamisole

3.3 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผงพุงทะลายและสารสกัดเปล้าแดงในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

3.3.1 การศึกษาฤทธิ์ mitogenic activity ของสมุนไพรต่อการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือด ข า ว ใ น สัตว์ทดลอง

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า การให้สมุนไพรพุงทะลายกับหนูทดลองในสภาวะร่างกายปกติ มีแนวโน้มที่จะสามารถเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดได้. แต่เมื่อให้สมุนไพรในสภาวะที่ร่างกายถูกกดภูมิคุ้มกัน, สมุนไพรพุงทะลายไม่สามารถช่วยลดผลกระทบจากการกดการสร้างเม็ดเลือดขาวของยา cyclophosphamide, ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดเปล้าตะวันที่มีแนวโน้มในการช่วยลดผลกระทบของยา cyclophosphamide โดยมิได้แสดงแนวโน้มในการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวในสภาวะที่ร่างกายปกติ. ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่า สมุนไพรทั้งสองชนิดมีการทำงานเสริมฤทธิ์กันหรือไม่.

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มควบคุมมีความเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นเท่ากับ 14.62 เปอร์เซ็นต์. ขณะที่หนูกุลุ่มที่ได้รับสมุนไพรพุงทะลายในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เม็ดเลือดขาวจะเพิ่มขึ้นเท่ากับ 42.3 เปอร์เซ็นต์, มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม. แต่การให้สมุนไพรพุงทะลายร่วมกับสารสกัดเปล้าตะวันทำให้เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นน้อยกว่าการให้สมุนไพรพุงทะลายเพียงอย่างเดียว และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม. สำหรับกลุ่มที่ได้รับ levamisole จะมีเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ดังรูปที่ 2.



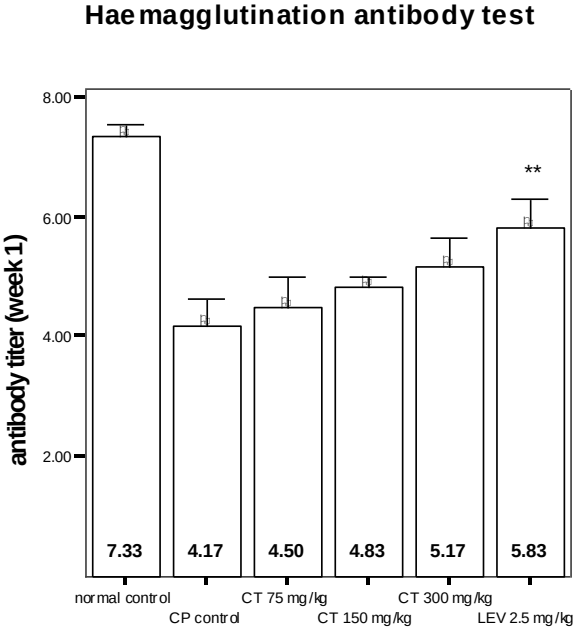
รูปที่ 2. การกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาวของสมุนไพรพุงทะลาย และสารสกัดเปล้าตะวันในหนูขาว.

แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวในหนูกลุ่มต่างๆ ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย SS = *Scaphium scaphigerum*, CT = *Croton thorelii*, LEV = levamisole เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $p < 0.05$.

3.3.2 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบสารน้ำของสมุนไพรพุงทะลายและสารสกัดเปล้าตะวัน ในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

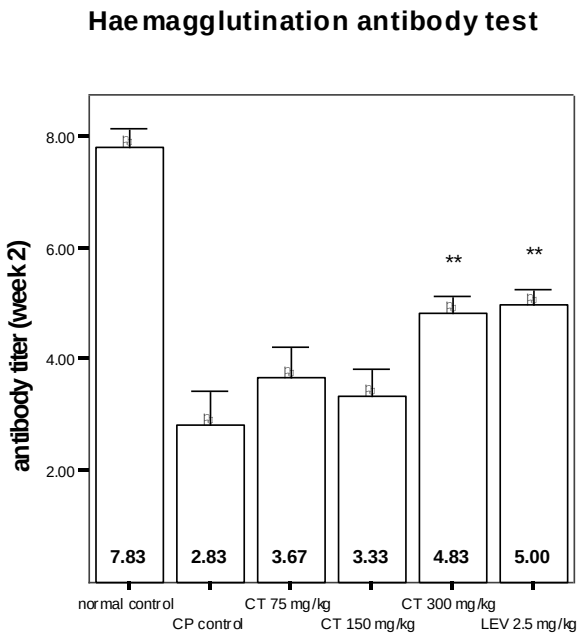
ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มควบคุมที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นของเม็ดเลือดแดงแกะได้ดี, โดยเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างแอนติบอดีในปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 7.33 ในสัปดาห์ที่ 1 และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 เป็น 7.83. เมื่อให้ยา cyclophosphamide ในหนู จะพบว่าความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงแกะจะลดลงเหลือ 4.17 ในสัปดาห์ที่ 1 และแอนติบอดีจะลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 2 เหลือเท่ากับ 2.83. การให้สารสกัดเปล้าตะวันในหนูที่ได้รับยา cyclophosphamide สามารถช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดีอย่างแปรผันตามขนาดของสารสกัดที่ให้ในสัปดาห์ที่ 1 และพบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 2. หนูกลุ่มที่ได้รับยา levamisole จะสามารถสร้างแอนติบอดีได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 ดังรูปที่ 3

และ 4. สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรพุงทะลายหรือสมุนไพรพุงทะลายร่วมกับสารสกัดเปล้าตะวันไม่ได้แสดงการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอนติบอดีอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน, จึงไม่แสดงผลในกราฟ.



รูปที่ 3. ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบสารน้ำของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน (สัปดาห์ที่ 1).

แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ยของค่า $\log_2$ แอนติบอดีไตเตอร์ ที่ปรากฏในสัปดาห์ที่ 1 พร้อมแสดงค่าความคาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย CT = *Croton thorelii* , LEV = levamisole เครื่องหมาย ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $p < 0.01$.

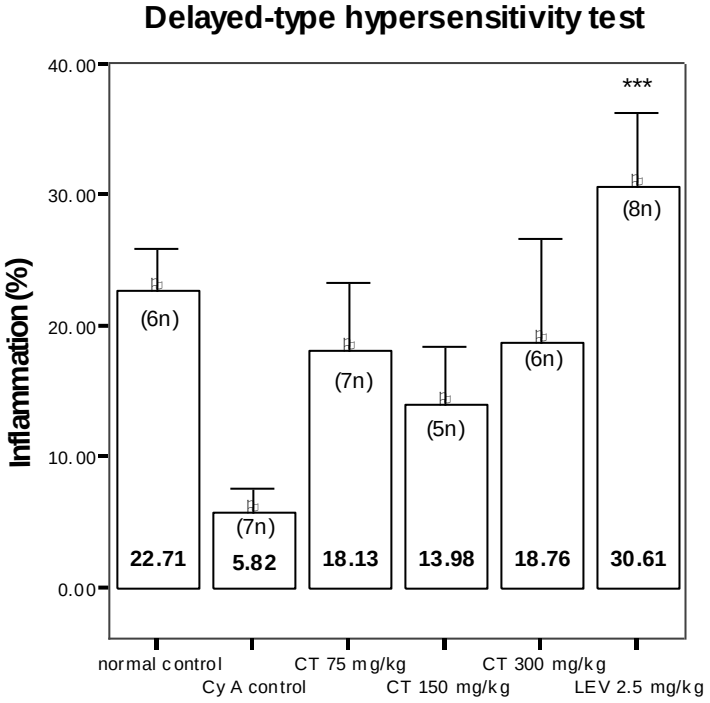


รูปที่ 4. ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบสารน้ำของสารสกัดเปล้าตะวัน ในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน (สัปดาห์ที่ 2)

แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ยของค่า $\log_2$ แอนติบอดีไตเตอร์ ที่ปรากฏในสัปดาห์ที่ 1 พร้อมแสดงค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย CT = *Croton thorelii* , LEV = levamisole เครื่องหมาย ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $p< 0.01$.

3.3.3 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบพึ่งเซลล์ของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มควบคุมที่มีภูมิคุ้มกันเป็นปกติสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นของ ovalbumin ได้, ทำให้บริเวณอุ้งเท้าซ้ายที่ฉีด ovalbumin เกิดการอักเสบคิดเป็น 22.71 เปอร์เซ็นต์. การให้ยา cyclosporin A กับหนูทดลองทำให้การทำงานของภูมิคุ้มกันบกพร่องเป็นผลให้ปฏิกริยาการอักเสบที่ตอบสนองต่อ ovalbumin ลดลงอย่างชัดเจนเหลือเพียง 5.82 เปอร์เซ็นต์. การให้สารสกัดเปล้าตะวันในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน พบว่า ทำให้ปฏิกริยาการอักเสบเพิ่มขึ้นเป็น 18.76 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่ม CT 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม). อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน. สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับ levamisole จะเกิดปฏิกิริยาการอักเสบเท่ากับ 30.61 เปอร์เซ็นต์ และแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ $p> 0.001$ ดังรูปที่ 5.



รูปที่ 5. ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในแบบพึ่งเซลล์ของสารสกัดเปล้าตะวันในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการอักเสบพร้อมแสดงค่าความคาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย CT = *Croton thorelii* , LEV = levamisole เครื่องหมาย *** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (CyA control) ที่ $p < 0.001$

3.4 การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน

จากขั้นตอนการเตรียมเซล์ม้าม พบว่า เซลล์ม้ามมีอัตราการมีชีวิต (cell viability) มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์. การกระตุ้นเซลล์ม้ามด้วย ovalbumin ในหนูกลุ่มควบคุม (control) ที่ถูกกดภูมิคุ้มกันโดยไม่ได้รับสารทดสอบ จะแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ IL-2 เท่ากับ 47.49±12.1 พิโกกรัม/มิลลิลิตร. การป้อนผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันที่ระดับต่างๆ สามารถช่วยเพิ่มปริมาณของ IL-2 ได้, โดยเฉพาะที่ระดับ 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 125.84±25.2 พิโกกรัม/มิลลิลิตร. จากการคำนวณทางสถิติแบบ oneway-ANOVA พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารมาตรฐาน levamisole ในขนาด 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีการสร้าง IL-2 เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน.

ตารางที่ 3. ฤทธิ์การกระตุ้นการสร้างไซโทไคน์จากเซลล์ม้ามของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

	กลุ่มควบคุม	ผลิตภัณฑ์เปล้า 325 มก./กก.	ผลิตภัณฑ์เปล้า 650 มก./กก.	ผลิตภัณฑ์เปล้า 1300 มก./กก.	levamisole 2.5 มก./กก.
IL-2 (พก./มล.)	47.49±12.1 (n=8)	93.26±24.2 (n=8)	65.01±14.5 (n=7)	125.84±25.2* (n=6)	121.05±16.9* (n=9)

หมายเหตุ: วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี oneway ANOVA เครื่องหมาย * แสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

หลังจากฉีดสารเหนี่ยวนำ (1% carrageenan) ให้เกิดการอักเสบและบวมแบบเฉียบพลันที่อุ้งเท้าข้างขวาของหนูทุกกลุ่ม และวัดความเปลี่ยนแปลงของปริมาตรของเท้าหนูที่เวลา 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง, พบว่า หนูกลุ่มควบคุมมีการบวมของอุ้งเท้าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 38.4±6.7, 50.36±6 และ 54.79±6.8, ตามลำดับ. หนูกลุ่มทดลองที่ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในขนาด 325 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะมีร้อยละการบวมของอุ้งเท้าในชั่วโมงที่ 1-3 เท่ากับ 38.86±4.0, 38.55±5.4 และ 49.73±7.7, ซึ่งค่าดังกล่าวน้อยกว่ากลุ่มควบคุมในชั่วโมงที่ 2-3 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ. การให้ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ในขนาด 650 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้มีร้อยละการบวมของอุ้งเท้าเท่ากับ 39.75±6.1, 36.18±4.7 และ 38.02±6.6 เรียงตามลำดับชั่วโมงที่ 1-3, ซึ่งลดน้อยกว่ากลุ่มควบคุมในชั่วโมงที่ 2-3. การให้ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในขนาด 1300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะมีผลให้การบวมของอุ้งเท้าลดน้อยลง, โดยวัดการบวมของอุ้งเท้าได้เท่ากับ 20.89±3.3, 33.20±5.47 และ 34.22±6.9 ตามเวลาชั่วโมงที่ 1-3, ซึ่งลดลงอย่างเด่นชัดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-3, โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p< 0.01$ และ $p< 0.05$. สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับยามาตรฐาน phenylbutazone ในขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะมีการบวมของอุ้งเท้าน้อยที่สุด, โดยมีร้อยละการบวมของอุ้งเท้าในชั่วโมงที่ 1-3 เท่ากับ 12.42±1.9, 7.75±1.1 และ 4.01±1.4, ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p< 0.01$ ดังแสดงในตารางที่ 4.

ตารางที่ 4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบในหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับสารแขวนลอยตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ขนาด 325, 650 และ 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับสารแขวนลอยพื้นฐานปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดลอง

กลุ่ม	ร้อยละของการอักเสบ		
	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3
ควบคุม	38.40 ± 6.7 (0)	50.36 ± 6.0 (0)	54.79 ± 6.8 (0)
ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 325 มก./กก.	38.86 ± 4.0 (0)	38.55 ± 5.4 (23.4)	49.73 ± 7.7 (9.2)
ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มก./กก.	39.75 ± 6.1 (0)	36.18 ± 4.7 (28.1)	38.02 ± 6.6 (30.6)
ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 1,300 มก./กก.	20.89 ± 3.3** (45.6)	33.20 ± 5.47 * (34.1)	34.22 ± 6.9 * (37.5)
ยา Phenylbutazone	12.40 ± 1.9 ** (67.7)	7.75 ± 1.1 ** (84.6)	4.01 ± 1.4 ** (92.6)

หมายเหตุ: ( ) ตัวเลขภายในวงเล็บ หมายถึง ค่าร้อยละการยับยั้งการอักเสบเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ชั่วโมงต่างๆ

0 หมายถึง ไม่มีการยับยั้งการอักเสบ

* และ ** หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ

3.6 การทดสอบฤทธิ์ลดไข้ของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

ภายหลังการฉีด brewer yeast เข้าใต้ผิวหนังเป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า หนูแต่ละกลุ่มจะมีอุณหภูมิร่างกายเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.5-1.7 องศาเซลเซียส, ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยอุณหภูมิที่สูงขึ้นในแต่ละกลุ่ม. หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับการป้อน CMC 1% จะมีอุณหภูมิลดต่ำลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 1 และ 2. สำหรับกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในขนาด 325 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะมีอุณหภูมิร่างกายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 และต่ำกว่าอย่างเด่นชัดในชั่วโมงที่ 3, โดยมีค่าร้อยละการลดไข้เท่ากับ 42.29±12.3. การให้ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในขนาดที่สูงขึ้น คือ 650 และ 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่ได้แสดงร้อยละของการลดไข้แตกต่างจากกลุ่มควบคุม. สำหรับสารมาตรฐาน diclofenac แสดงฤทธิ์ลดไข้ได้ตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 1-3 โดยลดไข้ได้ที่ร้อยละ 90.

ตารางที่ 5. ผลการทดสอบฤทธิ์ลดไข้ในหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับสารแขวนลอยตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ขนาด 325, 650 และ 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับสารแขวนลอยพื้นฐานปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดลอง

กลุ่ม	ร้อยละของการลดไข้		
	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3
ควบคุม	13.78 ± 6.8	22.00 ± 6.3	21.63 ± 7.9
เปล้าตะวัน 325 มก./กก.	18.98 ± 7.8	30.29 ± 11.5	42.29 ± 12.3 *
เปล้าตะวัน 650 มก./กก.	14.06 ± 8.1	16.14 ± 5.5	24.40 ± 7.8
เปล้าตะวัน 1300 มก./กก.	17.21 ± 7.2	19.22 ± 9.2	22.76 ± 8.8
Diclofenac 2 มก./กก.	90.05 ± 5.5 **	90.14 ± 5.4 **	90.32 ± 5.0 **

หมายเหตุ: * และ ** หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ

3.7 การทดสอบฤทธิ์คลายกังวลของผลิตภัณฑ์

หลังจากให้สารละลาย corticosterone ในน้ำดื่มสำหรับหนูทดลองเป็นเวลา 16 วัน แล้วให้สารทดสอบแกรนูลของผลิตภัณฑ์ผสมเปล้าแดงและพุงทะลายในขนาดต่างๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์คลายกังวลด้วยวิธี light/dark task, ผลการทดลอง พบว่า หนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบที่ขนาด 650 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว แสดงแนวโน้มในการลดอาการวิตกกังวลในหนูทดลองได้. ดังจะเห็นได้จากค่า time spent in light chamber มีค่าสูงกว่า และค่า latency to enter the light chamber มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แม้จะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), แต่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกับสารมาตรฐาน phenobarbital, ซึ่งกลุ่มสารมาตรฐานมีค่าที่เป็นตัวแปร ได้แก่ number of entries in light and dark chamber, และ number of locomotor activity in dark chamber สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), ดังแสดงในตารางที่ 6. ใน ขณะที่การทดสอบ hole board ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.

ตารางที่ 6. ผลการทดสอบฤทธิ์คลายกังวล โดยแสดงเป็นพฤติกรรมของความวิตกกังวลใน light/dark chamber ของสารทดสอบแกรนูลของผลิตภัณฑ์ผสมเปล้าแดงและ พุงทะลาย ที่ขนาด 325, 650 และ 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มสารมาตรฐาน (phenobarbital)

Group	No. of entries in chamber		No. of rear in chamber		No. of locomotor activities		Time spent in light chamber (วินาที)	Latency to enter the light chamber (วินาที)
	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark		
Control	14.0±2.0	14.8±1.9	23.6±5.1	48.6±4.9	31.0±3.8	47.6±5.7	162.6±20.9	437.2±21.3
Phenobarbital	22.8±2.1[a]	23.4±1.9[a]	32.4±4.1	48.2±3.9	49.2±6.0	99.6±7.1 [a]	235.4±12.1	366.0±11.7
สารทดสอบ 325 มก./กก.	13.6±1.5	14.2±1.4	14.6±3.6	33.4±5.8	23.2±3.4	57.2±12.9	166.8±29.2	433.0±29.4
สารทดสอบ 650 มก./กก.	16.6±1.2	16.8±1.3	20.2±2.7	27.6±3.9 [a]	29.8±4.4	52.8±10.4	225.2±20.1	375.2±37.4
สารทดสอบ 1,300 มก./กก.	11.8±1.5	12.4±1.4	16.4±3.9	30.8±4.7	22.0±4.3	56.6±8.6	165.8±28.6	434.8±28.9

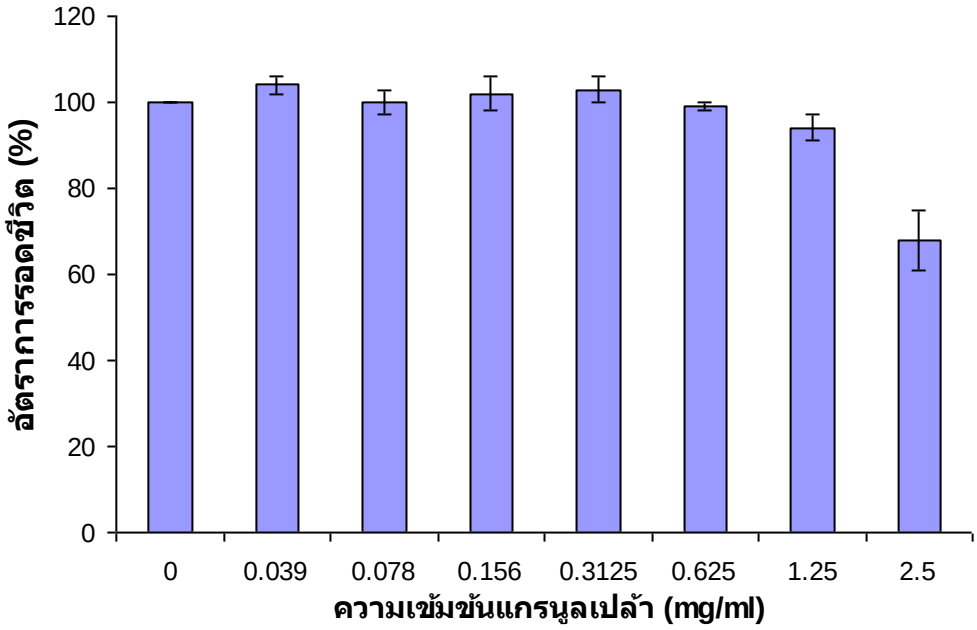
หมายเหตุ: [a] = $p < 0.05$

3.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันต่อเซลล์ชนิด HepG2; a human liver hepatocarcinoma cell line

จากการทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นด้วยการตรวจสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันโดยวิธี MTT assay พบว่า ที่ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078 และ 0.039 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นั้นก่อให้เกิด formazan product, ซึ่งเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร จะแสดงให้เห็นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตรอด. โดยพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์, อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ลดลงตาม dose response เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (blank), ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 6, ซึ่งเป็นผลจากการที่ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปทำปฏิกิริยาต่อเซลล์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม.

ตารางที่ 7. อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ตับ

Test sample	ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)								
	0	0.039	0.078	0.156	0.3125	0.625	1.25	2.5	5
% viability	100±0	104±2	100±3	102±4	103±3	99±1	94±3	68±7	-



รูปที่ 6. อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ตับเมื่อสัมผัสสารทดสอบผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันความเข้มข้นต่าง ๆ

3.9 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

อาการผิดปกติ

หนูกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันทุกขนาดไม่พบอาการผิดปกติและไม่พบการตาย. จากการชั่งน้ำหนัก พบว่า หนูเพศเมียในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ทดสอบขนาด 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวบันทึกผลในวันที่ 8 มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าหนูในกลุ่มควบคุม และตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในจากการชันสูตรซาก (gross pathology) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดสอบ.

ตารางที่ 8. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

เพศ	ตัวอย่างทดสอบ/ขนาด	[a]ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	
		วันที่ 8	วันที่ 15
ผู้	**กลุ่มควบคุม** น้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	49.00 ± 3.87	69.80 ± 2.69
	กลุ่มทดสอบ ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	51.40 ± 3.52	72.20 ± 4.05
	กลุ่มทดสอบ ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	55.20 ± 1.28	77.20 ± 1.68
	กลุ่มทดสอบ ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	57.60 ± 2.15	72.20 ± 5.10
เมีย	**กลุ่มควบคุม** น้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบ	37.20 ± 1.39	47.40 ± 2.04
	กลุ่มทดสอบ ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	38.80 ± 2.63	47.40 ± 4.15
	กลุ่มทดสอบ ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	*30.80 ± 2.63	46.40 ± 2.08
	กลุ่มทดสอบ ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	33.60 ± 1.99	48.80 ± 2.97

หมายเหตุ: [a] น้ำหนักหนูทดลองที่เพิ่มขึ้น Mean ± SEM

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

NC = Not calculated ไม่ได้คำนวณเนื่องจากหนูทดลองตาย

3.10 การทดสอบผลของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ที่มีต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว

หลังจากวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว พบว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ที่หนูทั้งเพศผู้และเพศเมียได้รับมีผลทำให้ค่า % mitotic index ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ซึ่งบ่งชี้ว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันอาจมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ไขกระดูกเมื่อได้รับในปริมาณสูง, แต่ไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อโครโมโซมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.

ผลของการวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศผู้และเพศเมียหลังจากได้รับน้ำกลั่น, ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน และสาร cyclophosphamide สรุปไว้ในตารางที่ 9 และ 10, ตามลำดับ.

ตารางที่ 9. การวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศผู้หลังจากได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

กลุ่ม	ตัวอย่างทดสอบ	[a,b]%M.I. ± SEM	[a,c]ชนิดความเสียหายของโครโมโซม			จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เกิดความเสียหายต่อโครโมโซม
			Break	Exchange	Multiple Ab	
1	น้ำกลั่น	7.65 ± 0.59	0	0	0	0
2	ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน	*5.08 ± 0.13	0	0	0	0
3	CP	*3.01 ± 0.16	*15.00 ± 2.84	*3.60 ± 0.98	*3.60 ± 1.57	*13.00 ± 2.45

ตารางที่ 10. การวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศเมียหลังจากได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

กลุ่ม	ตัวอย่างทดสอบ	[a,b]%M.I. ± SEM	[a,c]ชนิดความเสียหายของโครโมโซม			จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เกิดความเสียหายต่อโครโมโซม
			Break	Exchange	Multiple Ab	
1	น้ำกลั่น	6.37 ± 0.12	0	0	0	0
2	ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน	*5.18 ± 0.27	0	0	0	0
3	CP	*2.36 ± 0.21	*13.00 ± 2.42	*5.60 ± 1.21	*8.80 ± 3.18	*20.40 ± 2.08

หมายเหตุ: [a] แสดงเป็นค่า Mean ± SEM

[b] Mitotic Index (M.I.) = นับจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟสทั้งหมด 2,000 เซลล์ต่อหนู 1 ตัว

[c] ดูความเสียหายของโครโมโซมทั้งหมด 50 เซลล์ต่อหนู 1 ตัว

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 9 และ10 สรุปได้ว่า ค่า % mitotic index ของหนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, ซึ่งบ่งชี้ว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน อาจมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ไขกระดูกเมื่อได้รับในปริมาณสูง.

เมื่อเปรียบเทียบดูชนิดความเสียหายของโครโมโซม พบว่า ตรวจไม่พบความเสียหายของโครโมโซมในหนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน, ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับหนูที่ได้รับน้ำกลั่น นั่นคือ ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ไม่มีผลทำให้โครโมโซมเสียหาย.

3.11 การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน

3.11.1 อาการทางพิษวิทยาที่พบในสัตว์ทดลอง

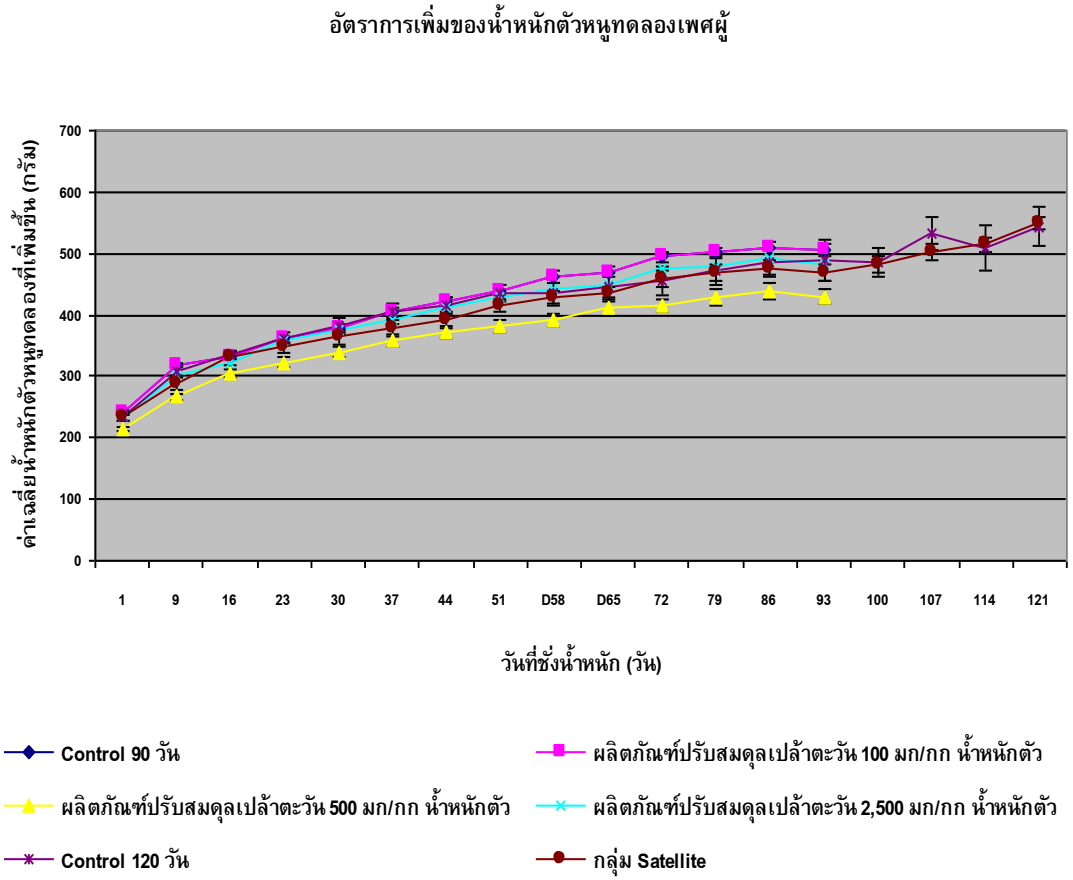
หลังป้อนตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite พบว่า หนูทุกตัวมีอาการปกติ, อาการทางพิษวิทยาที่สังเกตสรุปไว้ดังตารางที่ 11.

ตารางที่ 11. สรุปการตรวจอาการทางพิษวิทยาของสัตว์ทดลองหลังป้อนตัวอย่างทดสอบ ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน

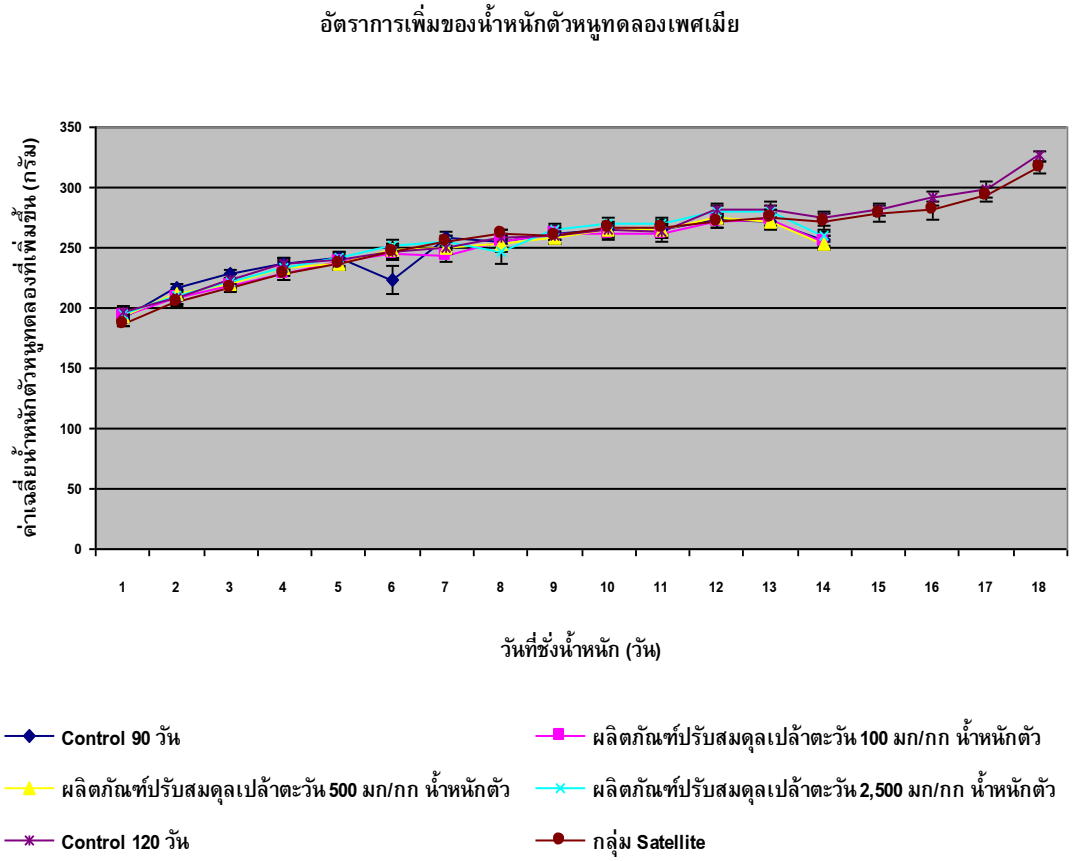
อาการทางพิษวิทยา	ผลการตรวจ	
	พบ	ไม่พบ
Hunched posture	-	/
Piloerection	-	/
Oedema	-	/
Erythema	-	/
Fasciculation	-	/
Ataxia	-	/
Convulsions	-	/
Tremor	-	/
Drowsiness	-	/
Lacrimation	-	/
Nasal discharge	-	/
Diarrhea	-	/
Feces	-	/
Diuresis	-	/
Dead	-	/

3.11.2 ผลต่อการเจริญเติบโต

หลังจากป้อนน้ำกลั่น, ตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ที่ขนาด 100, 500 และ 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ให้แก่หนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite, อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูทดลองเพศผู้และเพศเมียในแต่ละกลุ่มที่ชั่งระหว่างและสิ้นสุดการทดสอบ แสดงในรูปที่ 7 และ 8, ตามลำดับ.



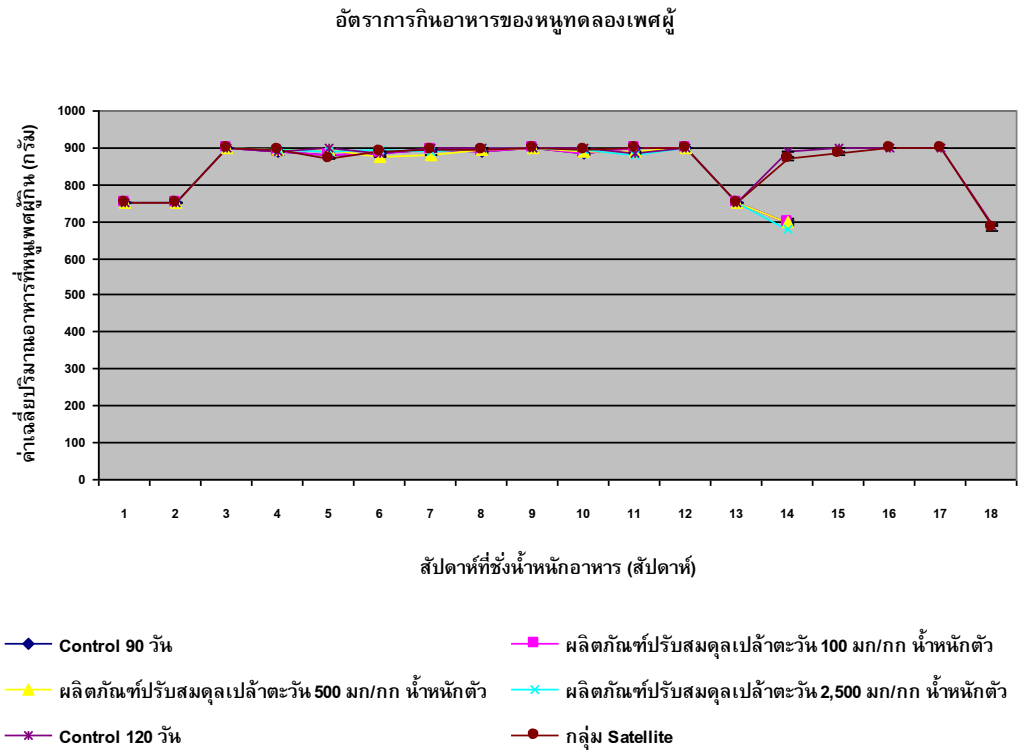
รูปที่ 7. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูทดลองเพศผู้หลังจากป้อนน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite.



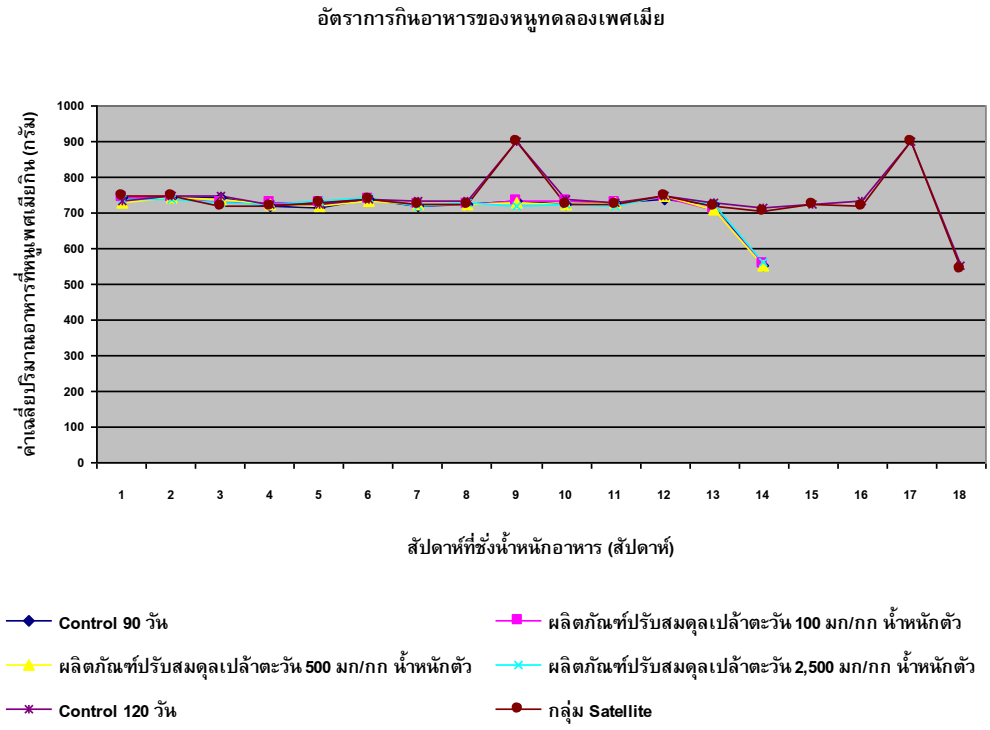
รูปที่ 8. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูทดลองเพศเมียหลังจากป้อนน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite.

3.11.3 ผลต่อการกินอาหาร (food consumption)

หลังจากป้อนตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ที่ขนาด 100, 500, และ 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และวัดปริมาณการกินอาหารทุกสัปดาห์ติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite, อัตราการกินอาหารของหนูทดลองเพศผู้และเพศเมียในแต่ละกลุ่มที่ชั่งทุกสัปดาห์ระหว่างและสิ้นสุดการทดสอบ, แสดงในรูปที่ 9 และ 10, ตามลำดับ.



รูปที่ 9. อัตราการกินอาหารของหนูทดลองเพศผู้หลังจากป้อนน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite.



รูปที่ 10. อัตราการกินอาหารของหนูทดลองเพศเมียหลังจากป้อนน้ำกลั่นและผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ติดต่อกันนาน 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ และ 120 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite

3.11.4 ผลต่อเคมีคลินิกของเลือด

หลังจากป้อนตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ที่ขนาด 100, 500, และ 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และวัดค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูเพศผู้และเพศเมีย ดังต่อไป นี้ albumin, alkaline phosphatase(ALP), alanine transminase (ALT), aspartate transaminase (AST), calcium, chloride, cholesterol, creatinine, gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), glucose, phosphorus, potassium, sodium, total bilirubin, total protein, triglyceride และ urea nitrogen, ซึ่งค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มต่างๆ ทั้งก่อนทำการทดสอบและเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ, สรุปไว้ในตารางที่ 12, 13, 14, 15, 16 และ 17, ตามลำดับ.

ตารางที่ 12. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)			
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (กลุ่ม satellite)
1. Albumin	4.75 ± 0.05	4.77 ± 0.04	4.60 ± 0.06*	4.70 ± 0.04	4.76 ± 0.07
2. Alkaline phosphatase	136.3 ± 6.19	134.50 ± 4.97	140.70 ± 5.61	144.40 ± 6.66	149.40 ± 3.41*
3. Alanine Transminase (ALT)	45.93 ± 4.30	39.00 ± 1.27	41.00 ± 1.66	40.00 ± 1.66	38.00 ± 1.33
4. Aspartate Transminase (AST)	307.67 ± 5.92	305.80 ± 10.96	316.20 ± 6.36	304.30 ± 9.56	316.40 ± 6.50
5. Calcium	11.23 ± 0.08	11.30 ± 0.09	10.90 ± 0.13*	11.10 ± 0.04	11.00 ± 0.09*
6. Chloride	101.40 ± 0.48	101.40 ± 0.37	101.60 ± 0.45	101.60 ± 0.52	101.00 ± 0.39
7. Chlolesterol	81.67 ± 3.29	76.80 ± 2.82	82.90 ± 5.07	84.10 ± 3.96	84.20 ± 1.50
8. Creatinine	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.38 ± 0.03*	0.42 ± 0.03*	0.42 ± 0.03*
9. Gamma GT	1.44 ± 0.28	1.10 ± 0.22	0.70 ± 0.13*	0.60 ± 0.17*	1.50 ± 0.24
10. Glucose	38.27 ± 5.16	29.00 ± 4.33	23.00 ± 4.03*	27.00 ± 4.38	23.00 ± 4.22*
11. Phosphorus	15.21 ± 0.51	15.70 ± 0.70	13.50 ± 0.58*	14.80 ± 0.87	7.90 ± 0.07*
12. Potassium	7.69 ± 0.12	7.53 ± 0.12	7.30 ± 0.08*	7.40 ± 0.12*	7.40 ± 0.12*
13. Sodium	152.80 ± 1.10	151.20 ± 0.87	150.10 ± 0.53*	150.90 ± 0.43	151.60 ± 0.54
14. Total Bilirubin	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
15. Total Protein	6.74 ± 0.06	6.70 ± 0.10	6.43 ± 0.06*	6.57 ± 0.07*	6.70 ± 0.08
16. Triglyceride	101.3 ± 7.49	87.30 ± 9.00	98.20 ± 6.27	99.80 ± 9.29	98.80 ± 8.49
17. Urea Nitrogen	19.00 ± 0.94	15.20 ± 1.09*	15.90 ± 1.26*	15.30 ± 0.86*	15.20 ± 1.07*

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)		
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว
1. Albumin	4.52 ± 0.06	4.48 ± 0.06	4.44 ± 0.17	4.93 ± 0.05*
2. Alkaline phosphatase	59.60 ± 3.49	53.00 ± 2.41	53.90 ±2.74	61.20 ± 3.43
3. Alanine Transminase (ALT)	150.10 ± 27.15	118.40 ± 16.88	137.20 ± 35.43	105.50 ±22.21
4. Aspartate Transminase (AST)	149.50 ± 15.45	171.10 ± 15.23	161.20 ± 19.90	158.00 ± 22.21
5. Calcium	12.44 ± 0.20	12.70 ± 0.13	12.18 ± 0.13	13.20 ± 0.28*
6. Chloride	107.20 ± 0.61	107.30 ± 0.45	107.00 ± 0.45	107.10 ± 0.72
7. Chlolesterol	63.80 ± 3.90	54.80 ± 2.84*	56.70 ± 4.37	78.30 ± 6.18*
8. Creatinine	0.41 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.49 ± 0.06	0.41 ± 0.02
9. Gamma GT	<0.00	0.10	<0.00	0.90 ± 0.31
10. Glucose	304.70 ± 21.45	283.50 ± 9.08	242.40 ± 15.23*	289.10 ± 15.29
11. Phosphorus	12.32 ± 0.96	12.48 ± 0.80	12.69 ± 1.11	15.88 ± 2.17
12. Potassium	9.06 ± 0.91	8.08 ± 0.42	9.18 ± 0.76	9.91 ± 0.82
13. Sodium	149.30 ± 0.97	150.40 ± 0.37	149.10 ± 0.66	149.30 ± 1.01
14. Total Bilirubin	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
15. Total Protein	6.53 ± 0.10	6.49 ± 0.07	6.24 ± 0.09*	7.08 ± 0.10*
16. Triglyceride	60.90 ± 4.71	68.90 ± 6.97	49.70 ± 4.56	41.70 ± 4.60*
17. Urea Nitrogen	20.69 ± 0.76	23.05 ± 1.13	23.32 ± 1.78	26.84 ± 1.82*

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 14. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (Mean±SE)
1. Albumin	4.58 ± 0.07	4.44 ± 0.06
2. Alkaline phosphatase	54.80 ± 5.05	46.60 ± 1.98
3. Alanine Transminase (ALT)	130.60 ± 48.67	59.30 ± 6.17
4. Aspartate Transminase (AST)	157.80 ± 38.91	124.30 ± 7.58
5. Calcium	12.38 ± 0.30	11.87 ± 0.25
6. Chloride	103.80 ± 0.58	103.70 ± 0.30
7. Chlolesterol	53.20 ± 4.05	66.50 ± 5.03*
8. Creatinine	0.50 ± 0.08	0.50 ± 0.01
9. Gamma GT	0.60 ± 0.00	0.73 ± 0.13
10. Glucose	311.20 ± 31.98	322.90 ± 21.30
11. Phosphorus	9.50 ± 0.66	10.75 ± 0.76
12. Potassium	9.90 ± 0.69	8.20 ± 0.44*
13. Sodium	146.40 ± 0.93	145.90 ± 0.41
14. Total Bilirubin	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.01
15. Total Protein	6.50 ± 0.13	6.40 ± 0.07
16. Triglyceride	70.40 ± 8.37	53.50 ± 5.89
17. Urea Nitrogen	17.20 ± 1.24	17.70 ± 0.68

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 15. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)			
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (กลุ่ม satellite)
1. Albumin	4.70 ± 0.06	4.74 ± 0.06	4.64 ± 0.08	4.70 ± 0.06	4.79 ± 0.04
2. Alkaline phosphatase	88.40 ± 6.03	91.50 ± 5.96	91.40 ± 10.06	82.80 ± 5.26	91.50 ± 4.45
3. Alanine Transminase (ALT)	39.00 ± 7.79	27.20 ± 1.06	29.90 ± 1.20	31.50 ± 1.19	31.80 ± 1.72
4. Aspartate Transminase (AST)	314.93 ± 26.96	287.40 ± 6.11	275.90 ± 7.78	298.80 ± 9.69	309.80 ± 8.87
5. Calcium	10.26 ± 0.07	9.96 ± 0.51	10.21 ± 0.08	10.22 ± 0.04	10.52 ± 0.06*
6. Chloride	137.93 ± 0.89	137.00 ± 1.14	138.00 ± 1.41	138.00 ± 2.01	140.00 ± 1.14
7. Chlolesterol	67.53 ± 2.11	64.70 ± 1.90	76.70 ± 3.99*	68.00 ± 3.86	68.40 ± 3.10
8. Creatinine	0.51 ± 0.03	0.40 ± 0.03*	0.50 ± 0.04	0.52 ± 0.03	0.64 ± 0.06*
9. Gamma GT	1.51 ± 0.22	1.13 ± 0.42	1.22 ± 0.25	1.02 ± 0.24	2.46 ± 0.24*
10. Glucose	19.73 ± 4.56	14.00 ± 2.69	11.00 ± 1.98*	14.10 ± 3.19	10.10 ± 2.28*
11. Phosphorus	11.88 ± 0.44	10.74 ± 0.70	11.53 ± 0.55	13.80 ± 0.75*	13.37 ± 0.79
12. Potassium	11.08 ± 0.11	10.16 ± 0.22*	11.60 ± 0.06	12.32 ± 0.58*	12.28 ± 0.60*
13. Sodium	224.33 ± 2.56	227.70 ± 2.87	230.40 ± 4.15	229.70 ± 3.69	233.80 ± 2.15*
14. Total Bilirubin	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01
15. Total Protein	6.64 ± 0.07	6.49 ± 0.04*	6.71 ± 0.06	6.66 ± 0.07	6.77 ± 0.08
16. Triglyceride	61.00 ± 2.79	75.00 ± 3.34*	72.00 ± 6.71	56.00 ± 2.56	61.00 ± 5.90
17. Urea Nitrogen	20.73 ± 1.63	20.80 ± 0.81	21.30 ± 1.50	20.70 ± 1.16	24.50 ± 1.73

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 16. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)		
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว
1. Albumin	4.53 ± 0.05	4.62 ± 0.07	4.70 ± 0.06*	4.94 ± 0.07*
2. Alkaline phosphatase	27.10 ± 3.60	24.90 ± 1.90	23.00 ±2.12	15.70 ± 1.11*
3. Alanine Transminase (ALT)	39.60 ± 3.42	42.80 ± 5.04	41.40 ± 3.62	33.20 ± 3.45
4. Aspartate Transminase (AST)	131.90 ± 10.47	127.70 ± 11.05	117.00 ± 5.56	119.70 ± 12.07
5. Calcium	11.77 ± 0.08	12.01 ± 0.12	10.90 ± 0.54	12.65 ± 0.20*
6. Chloride	110.30 ± 0.54	112.20 ± 0.33*	112.60 ± 0.40*	111.80 ± 0.33*
7. Chlolesterol	60.50 ± 4.43	47.40 ± 4.36*	57.60 ± 2.82	82.50 ± 5.21*
8. Creatinine	0.56 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.48 ± 0.02*	0.51 ± 0.03
9. Gamma GT	0.61 ± 0.14	0.93 ± 0.12	0.70 ± 0.13	1.31 ± 0.25*
10. Glucose	207.20 ± 14.45	158.40 ± 15.06*	186.20 ± 20.01	193.60 ± 15.56
11. Phosphorus	8.90 ± 0.66	10.23 ± 0.28*	10.28 ± 0.33*	11.97 ± 0.64*
12. Potassium	9.25 ± 0.30	10.91 ± 0.40*	11.12 ± 0.41*	10.66 ± 0.62*
13. Sodium	147.90 ± 0.66	148.00 ± 0.56	149.20 ± 0.42	149.90 ± 0.50*
14. Total Bilirubin	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.00*	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.02
15. Total Protein	6.27 ± 0.07	6.23 ± 0.09	6.37 ± 0.09	6.70 ± 0.11*
16. Triglyceride	41.60 ± 1.72	37.50 ± 2.26	33.40 ± 1.96*	27.30 ± 1.43*
17. Urea Nitrogen	23.98 ± 0.90	24.60 ± 1.25	26.42 ± 1.09	25.51 ± 0.93

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 17. ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก (blood chemistry) ของหนูเพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (Mean±SE)
1. Albumin	4.70 ± 0.08	4.79 ± 0.21
2. Alkaline phosphatase	24.20 ± 1.77	23.40 ± 1.89
3. Alanine Transminase (ALT)	71.20 ± 21.72	50.90 ± 4.66
4. Aspartate Transminase (AST)	212.20 ± 26.37	200.40 ± 29.58
5. Calcium	10.55 ± 0.11	11.22 ± 0.19*
6. Chloride	105.00 ± 0.95	105.80 ± 1.25
7. Chlolesterol	53.80 ± 5.54	64.70 ± 4.54
8. Creatinine	0.56 ± 0.04	0.59 ± 0.03
9. Gamma GT	1.46 ± 0.15	3.19 ± 0.86*
10. Glucose	145.60 ± 12.69	143.40 ± 8.91
11. Phosphorus	14.48 ± 0.67	14.67 ± 1.21
12. Potassium	12.34 ± 1.04	11.10 ± 0.61
13. Sodium	143.00 ± 1.76	146.10 ± 1.84
14. Total Bilirubin	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.02
15. Total Protein	6.40 ± 0.11	6.36 ± 0.06
16. Triglyceride	43.80 ± 6.69	46.10 ± 3.76
17. Urea Nitrogen	22.20 ± 1.93	25.30 ± 0.83

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.11.5 ผลต่อโลหิตวิทยา

หลังจากป้อนตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ที่ขนาด 100, 500 และ 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และวัดค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาของหนูเพศผู้และเพศเมีย ดังต่อไปนี้ Hgb, HCT, MCH, MCHC, MCV, PLT count, RBC และ WBC, ซึ่งค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนูเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มต่างๆ ทั้งก่อนทำการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ สรุปไว้ในตารางที่ 18, 19, 20, 21, 22 และ 23, ตามลำดับ.

ตารางที่ 18. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศผู้ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)			
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (กลุ่ม Satellite)
1. Hgb	16.30 ± 0.31	15.30 ± 0.20*	15.10 ± 0.25*	15.30 ± 0.25*	15.50 ± 0.32*
2. HCT	48.61 ± 1.04	46.50 ± 0.56*	45.50 ± 0.92*	45.80 ± 0.79*	45.80 ± 0.78*
3. MCH (พิโกกรัม)	21.26 ± 0.24	21.20 ± 0.38	21.40 ± 0.17	21.10 ± 0.24	21.40 ± 0.22
4. MCHC (กรัม/เดซิลิตร)	33.50 ± 0.30	32.60 ± 0.45	33.00 ± 0.40	33.30 ± 0.37	33.50 ± 0.45
5. MCV (เฟมโตลิตร)	63.10 ± 0.67	64.40 ± 0.74	64.20 ± 0.49	63.10 ± 0.48	63.60 ± 0.54
6. PLT (x1,000)	672.70 ± 15.52	712.00 ± 39.79	656.30 ± 41.77	634.40 ± 60.95	637.00 ± 47.20
7. RBC ($x10^6$)	7.69 ± 0.17	7.20 ± 0.11*	7.10 ± 0.13*	7.30 ± 0.13*	7.20 ± 0.11*
8. WBC (x1,000)	6.25 ± 0.38	5.98 ± 0.47	5.22 ± 0.26*	4.76 ± 0.34*	4.89 ± 0.36*

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 19. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศผู้ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)		
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว
1. Hgb	16.70 ± 0.21	16.50 ± 0.43	17.10 ± 0.16	15.90 ± 1.13
2. HCT	47.70 ± 0.87	47.30 ± 1.25	47.90 ± 0.60	45.20 ± 1.37
3. MCH (พิโกกรัม)	18.90 ± 0.15	19.10 ± 0.27	19.40 ± 0.22*	18.80 ± 1.10
4. MCHC (กรัม/เดซิลิตร)	34.90 ± 0.28	34.90 ± 0.27	35.70 ± 0.24*	34.80 ± 1.94
5. MCV (เฟมโตลิตร)	54.00 ± 0.57	54.70 ± 0.51	54.40 ± 0.41	53.80 ± 0.53
6. PLT (x1,000)	525.30 ± 21.48	490.50 ± 38.84	465.10 ± 16.80*	541.40 ± 50.72
7. RBC ($x10^6$)	8.80 ± 0.11	8.60 ± 0.21	8.80 ± 0.14	8.40 ± 0.22
8. WBC (x1,000)	6.69 ± 0.35	6.33 ± 0.47	5.99 ± 0.33	5.47 ± 0.35

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 20. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศผู้ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (Mean±SE)
1. Hgb	16.60 ± 0.17	16.00 ± 0.26*
2. HCT	49.80 ± 0.54	46.00 ± 0.88*
3. MCH (พิโกกรัม)	18.40 ± 0.32	18.80 ± 0.13
4. MCHC (กรัม/เดซิลิตร)	33.40 ±0.16	34.50 ± 0.26*
5. MCV (เฟมโตลิตร)	55.10 ± 0.90	54.40 ± 0.29
6. PLT (x1,000)	424.40 ± 29.99	432.00 ± 45.80
7. RBC ($x10^6$)	9.00 ± 0.21	8.50 ± 0.13*
8. WBC (x1,000)	6.97 ± 0.17	7.48 ± 0.41

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 21. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศเมีย ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)			
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว
1. Hgb	15.60 ± 0.20	15.60 ± 0.24	16.00 ± 0.23	16.00 ± 0.19	15.80 ± 0.22
2. HCT	44.38 ± 0.74	43.70 ± 0.86	44.50 ± 1.12	46.50 ± 0.66*	47.20 ± 0.96*
3. MCH (พิโกกรัม)	21.14 ± 0.13	21.80 ± 0.21*	22.10 ± 0.25*	21.60 ± 0.14*	21.30 ± 0.20
4. MCHC (กรัม/เดซิลิตร)	35.10 ± 0.26	35.60 ± 0.39	36.00 ± 0.44*	34.40 ± 0.22*	33.60 ± 0.31*
5. MCV (เฟมโตลิตร)	60.29 ± 0.41	61.50 ± 0.75	61.30 ± 0.72	62.70 ± 0.61*	63.50 ± 0.64*
6. PLT (x1,000)	738.78 ± 24.48	663.30 ± 49.43	674.13 ± 34.66	767.89 ± 52.86	812.13 ± 43.52
7. RBC ($x10^6$)	7.36 ± 0.10	7.10 ± 0.12	7.30 ± 0.16	7.40 ± 0.11	7.40 ± 0.14
8. WBC (x1,000)	4.60 ± 0.34	3.08 ± 0.20*	4.33 ± 0.49	4.88 ± 0.46	5.17 ± 0.53

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 22. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศเมีย ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)		
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว
1. Hgb	17.50 ± 0.19	17.50 ± 0.23	17.10 ± 0.23	15.60 ± 1.29
2. HCT	45.20 ± 0.55	45.50 ± 0.74	44.40 ± 0.80	42.00 ± 1.95
3. MCH (พิโกกรัม)	21.10 ± 0.16	21.50 ± 0.16	21.50 ± 0.22	20.10 ± 1.24
4. MCHC (กรัม/เดซิลิตร)	38.70 ± 0.21	38.40 ± 0.37	38.70 ± 0.24	36.50 ± 2.10
5. MCV (เฟมโตลิตร)	54.60 ± 0.32	55.80 ± 0.50*	55.50 ± 0.61	55.00 ± 0.42
6. PLT (x1,000)	566.50 ± 18.10	471.20 ± 36.21*	549.00 ± 29.45	579.56 ± 26.20
7. RBC ($x10^6$)	8.30 ± 0.10	8.20 ± 0.15	8.00 ± 0.14	7.60 ± 0.33*
8. WBC (x1,000)	3.74 ± 0.23	4.13 ± 0.22	3.80 ± 0.18	3.85 ± 0.17

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 23. ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematology) ของหนู Wistar rats เพศเมีย ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (Mean±SE)
1.Hgb	15.90 ± 0.19	15.90 ± 0.27
2.HCT	44.70 ± 0.93	43.70 ± 0.82
3.MCH (พิโกกรัม)	20.20 ± 0.38	20.10 ± 0.18
4.MCHC (กรัม/เดซิลิตร)	35.60 ± 0.51	36.40 ± 0.19
5.MCV (เฟมโตลิตร)	56.70 ± 0.52	55.30 ± 0.51*
6.PLT (x1000)	254.80 ± 57.70	346.20 ± 71.16
7. RBC ($x10^6$)	7.90 ± 0.15	7.90 ± 0.11
8.WBC (x1000)	3.91 ± 0.46	4.87 ± 0.37

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.11.6 ผลต่อเคมีคลินิกของปัสสาวะ

หลังจากป้อนตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันที่ขนาด 100, 500, และ 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และวัดค่าเคมีคลินิกในปัสสาวะของหนูเพศผู้และเพศเมีย ดังต่อไปนี้ specific gravity, leukocytes, nitrite, protein, glucose, ketone, uribilinogen, bilirubin และ erythrocytes, ซึ่งค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนูเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มต่างๆ ทั้งก่อนทำการทดสอบและเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ, สรุปไว้ในตารางที่ 24, 25, 26, 27, 28 และ 29, ตามลำดับ.

ตารางที่ 24. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)

พารามิเตอร์ในปัสสาวะ	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)			
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว
1. Specific Gravity	1.02 ± 0.00	1.01 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.01 ± 0.00	1.02 ± 0.00
2. pH	8.40 ± 0.16	8.80 ± 0.13*	8.67 ± 0.17	8.90 ± 0.10*	8.60 ± 0.16
3. Leukocyte	1.07 ± 0.28	2.10 ± 0.28*	1.67 ± 0.37	1.80 ± 0.29*	1.90 ± 0.28*
4. Nitrite	0.40 ± 0.13	0.40 ± 0.16	0.00 ± 0.00*	0.20 ± 0.13	0.10 ± 0.10*
5. Protein	0.67 ± 0.29	0.90 ± 0.41	0.67 ± 0.44	0.90 ± 0.38	1.20 ± 0.51
6. Glucose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
7. Ketone	0.40 ± 0.16	0.60 ± 0.16	0.22 ± 0.15	0.60 ± 0.16	0.70 ± 0.15
8. Uribilinogen	0.147 ± 0.19	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.10 ± 0.10	0.20 ± 0.13
9. Bilirubin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
10. Erythrocytes	0.33 ± 0.19	0.00 ± 0.00*	0.11 ± 0.11	0.10 ± 0.10	0.00 ± 0.00*

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 25. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)

พารามิเตอร์ในปัสสาวะ	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)		
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว
1. Specific Gravity	1.01 ± 0.00	1.01 ± 0.00	1.01 ± 0.00	1.02 ± 0.00*
2. pH	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	8.90 ± 0.10	8.70 ± 0.15*
3. Leukocyte	2.40 ± 0.16	2.50 ± 0.17	2.40 ± 0.22	2.90 ± 0.10*
4. Nitrite	0.10 ± 0.10	0.20 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.17*
5. Protein	1.00 ± 0.39	0.50 ± 0.17	0.30 ± 0.15	0.70 ± 0.30
6. Glucose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
7. Ketone	0.80 ± 0.13	1.00 ± 0.00	0.80 ± 0.13	1.00 ± 0.15
8. Uribilinogen	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
9. Bilirubin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
10. Erythrocytes	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.40

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 26. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)

พารามิเตอร์ในปัสสาวะ	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (Mean±SE)
1. Specific Gravity	1.01 ± 0.00	1.01 ± 0.00
2. pH	8.60 ± 0.40	8.80 ± 0.13
3. Leukocyte	1.60 ± 0.51	2.20 ± 0.29
4. Nitrite	0.60 ± 0.25	0.20 ± 0.13
5. Protein	0.40 ± 0.25	1.10 ± 0.38
6. Glucose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
7. Ketone	0.60 ± 0.40	0.50 ± 0.17
8. Uribilinogen	0.60 ± 0.60	0.00 ± 0.00
9. Bilirubin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
10. Erythrocytes	0.80 ± 0.58	1.30 ± 0.47

ตารางที่ 27. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน ก่อนทำการทดสอบ (before)

พารามิเตอร์ในปัสสาวะ	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)			
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว
1. Specific Gravity	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00
2. pH	8.33 ± 0.13	8.60 ± 0.16	8.30 ± 0.15	8.70 ± 0.15*	8.70 ± 0.15*
3. Leukocyte	0.27 ± 0.12	0.10 ± 0.10	0.10 ± 0.10	0.30 ± 0.21	0.60 ± 0.27
4. Nitrite	0.20 ± 0.11	0.20 ± 0.13	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
5. Protein	0.27 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.13	0.20 ± 0.20
6. Glucose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
7. Ketone	0.07 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.10	0.00 ± 0.00
8. Uribilinogen	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.10	0.00 ± 0.00
9. Bilirubin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
10. Erythrocytes	0.20 ± 0.15	0.60 ± 0.34	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.13	0.00 ± 0.00

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 28. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (after)

พารามิเตอร์ในปัสสาวะ	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)		
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว
1. Specific Gravity	1.01 ± 0.00	1.01 ± 0.00*	1.01 ± 0.00*	1.01 ± 0.00*
2. pH	9.00 ± 0.00	8.90 ± 0.10	8.00 ± 0.00	8.15 ± 0.08*
3. Leukocyte	2.10 ± 0.18	1.60 ± 0.27	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
4. Nitrite	0.50 ± 0.17	0.20 ± 0.13	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
5. Protein	1.70 ± 0.37	1.50 ± 0.43	1.80 ± 0.13*	1.40 ±0.16
6. Glucose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
7. Ketone	0.30 ± 0.15	0.10 ± 0.10	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
8. Uribilinogen	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
9. Bilirubin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
10. Erythrocytes	0.10 ± 0.10	0.60 ± 0.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 29. ค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (urinalysis) ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม Satellite (after)

พารามิเตอร์ในปัสสาวะ	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (Mean±SE)
1. Specific Gravity	1.01 ± 0.00	1.01 ± 0.00
2. pH	9.00 ± 0.00	8.90 ± 0.10
3. Leukocyte	1.40 ± 0.60	0.90 ± 0.28
4. Nitrite	0.60 ± 0.25	0.40 ± 0.16
5. Protein	0.80 ± 0.58	0.00 ± 0.00
6. Glucose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
7. Ketone	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
8. Uribilinogen	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
9. Bilirubin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
10. Erythrocytes	2.00 ± 0.55	1.40 ± 0.45

3.11.7 ผลต่อน้ำหนักของอวัยวะภายใน (relative internal organ weight)

หลังจากป้อนตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันที่ขนาด 100, 500, และ 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และชั่งน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูเพศผู้และเพศเมีย ดังต่อไปนี้ สมอง, ต่อมไทมัส, หัวใจ, ปอด, ตับ, ม้าม, ไต, ลำไส้, อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ และอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย, ซึ่งน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มต่างๆ, สรุปไว้ในตารางที่ 30, 31, 32 และ 33, ตามลำดับ

ตารางที่ 30. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน

อวัยวะภายใน	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)		
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว
1. Brain	2.18 ± 0.07	2.14 ± 0.08	2.23 ± 0.05	2.24 ± 0.06
2. Thymus	0.66 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.62 ± 0.02	0.70 ± 0.03
3. Heart	1.80 ± 0.05	1.74 ± 0.05	1.49 ± 0.05*	1.70 ± 0.07
4. Lung	2.00 ± 0.08	2.17 ± 0.08	1.94 ± 0.07	2.32 ± 0.09*
5. Liver	15.46 ± 0.49	15.98 ± 0.42	14.29 ± 0.05	19.00 ± 0.71*
6. Spleen	0.95 ± 0.07	1.07 ± 0.05	0.86 ± 0.09	1.06 ± 0.05
7. Kidney	3.72 ± 0.12	3.79 ± 0.25	3.66 ± 0.09*	4.15 ± 0.17*
8. Gut	28.31 ± 1.65	30.82 ± 1.17	26.38 ± 1.22	32.23 ± 2.06
9. Testis & Epididymis	7.70 ± 0.30	7.62 ± 0.22	6.72 ± 0.21*	7.56 ± 0.16

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 31. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนู Wistar rats เพศผู้ในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน (กลุ่ม Satellite)

อวัยวะภายใน	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (Mean±SE)
1. Brain	2.22 ± 0.10	2.13 ± 0.09
2. Thymus	0.75 ± 0.10	0.67 ± 0.06
3. Heart	1.82 ± 0.12	1.79 ± 0.07
4. Lung	2.73 ± 0.20	2.27 ± 0.07*
5. Liver	18.83 ± 1.02	16.53 ± 0.41*
6. Spleen	1.14 ± 0.10	1.15 ± 0.05
7. Kidney	3.80 ± 0.70	4.23 ± 0.15
8. Gut	27.58 ± 3.86	28.60 ± 2.47
9. Testis & Epididymis	7.97 ± 0.62	8.14 ± 0.71

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 32. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 90 วัน

อวัยวะภายใน	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน (Mean±SE)		
		100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว
1. Brain	2.01 ± 0.08	1.97 ± 0.13	2.30 ± 0.12*	2.11 ± 0.05
2. Thymus	0.36 ± 0.03	0.45 ± 0.03*	0.70 ± 0.09*	0.46 ± 0.03*
3. Heart	1.09 ± 0.03	1.11 ± 0.04	1.37 ± 0.11*	1.14 ± 0.05
4. Lung	1.48 ± 0.07	1.79 ± 0.14*	2.05 ± 0.14*	1.88 ± 0.11*
5. Liver	7.87 ± 0.28	8.50 ± 0.31	9.30 ± 0.25*	10.88 ± 0.50*
6. Spleen	0.56 ± 0.02	0.73 ± 0.04*	0.97 ± 0.10*	0.73 ± 0.03*
7. Kidney	2.25 ± 0.07	2.26 ± 0.05	2.70 ± 0.17*	2.58 ± 0.09*
8. Gut	17.49 ± 0.95	16.78 ± 0.96	17.07 ± 0.94	18.76 ± 0.89
9. Ovary & Uterus	1.30 ± 0.16	1.40 ± 0.13	1.57 ± 0.17	1.44 ± 0.10

หมายเหตุ: *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 33. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนู Wistar rats เพศเมียในกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 120 วัน (กลุ่ม Satellite)

อวัยวะภายใน	กลุ่มควบคุม (Mean±SE)	ผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (Mean±SE)
1. Brain	1.97 ± 0.14	1.91 ± 0.07
2. Thymus	0.54 ± 0.07	0.50 ± 0.04
3. Heart	1.27 ± 0.07	1.30 ± 0.05
4. Lung	1.63 ± 0.15	1.77 ± 0.09
5. Liver	9.51 ± 0.89	10.37 ± 0.55
6. Spleen	0.74 ± 0.08	0.70 ± 0.03
7. Kidney	2.41 ± 0.10	2.54 ± 0.07
8. Gut	20.79 ± 2.68	19.74 ± 1.02
9. Ovary & Uterus	1.55 ± 0.25	1.43 ± 0.14

3.11.8 การตรวจผลทางจุลพยาธิวิทยาของการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (90 วัน) ของผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวัน

เมื่อเสร็จสิ้นระยะเวลาการทดสอบเป็นเวลา 90 วัน สัตว์ทดลองแต่ละตัวจะถูกทำการุณยฆาต (euthanasia) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์, แล้วเปิดหน้าท้องเพื่อตรวจทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในต่างๆ ในระดับที่มองด้วยตาเปล่า (gross pathology examination) ได้แก่ สมอง, ไทมัส, หัวใจ, ปอด, ตับ , ม้าม, ต่อมหมวกไต, ไต, ตับอ่อน, ลำไส้เล็กส่วนต้น, ลำไส้เล็กส่วนกลาง, ลำไส้เล็กส่วนปลาย, ลำไส้ใหญ่, รังไข่ และอัณฑะ บันทึกความผิดปกติของอวัยวะเหล่านั้น เช่น สี, ขนาด และ ตำแหน่ง. หลังจากนั้น เก็บตัวอย่างอวัยวะดังกล่าวแช่ในสาร buffer formalin ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์.

ตัวอย่างชิ้นเนื้อของอวัยวะต่างๆ จากหนูทดลองจาก 5 กลุ่มการทดลอง ได้แก่.

(1) กลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น.

(2) กลุ่มทดลองที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว.

(3) กลุ่มทดลองที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว.

(4) กลุ่มทดลองที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันขนาด 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว.

(5) กลุ่มทดลองที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันขนาด 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนัก ตัว, แล้วหยุดรับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันเป็นเวลา 30 วัน (Satellite group).

ทุกกลุ่มทดลองจะได้รับการตรวจเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา (histopathology) โดยตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากอวัยวะที่ผ่านการตรึงสภาพในน้ำยา 10% buffer formalin นานอย่างน้อย 3 วัน, โดยทำการตัดชิ้นเนื้อตามขวางและตามยาว (cross and long section). นำชิ้นเนื้อเหล่านี้ไปผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อทำ paraffin block และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี hematoxylin & eosin (H&E) ตรวจดูความผิดปกติของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (histopathological examination) โดยทีมพยาธิแพทย์ประกอบด้วย ศ.น.สพ.ดร.วิทยา ธรรมวิทย์ และ รศ.ลักขณา หิมะคุณ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ผลการตรวจเนื้อเยื่อพยาธิวิทยาแสดงผลดังต่อไปนี้

สมอง

เนื้อเยื่อสมองประกอบไปด้วยเซลล์สมอง (NEURONS) ชนิดต่างๆ เรียงตัวเป็นชั้นๆ, จากชั้นนอกเข้าสู่ชั้นใน. ผลการตรวจเนื้อเยื่อสมอง ไม่พบการคั่งของเลือด, ไม่พบการบวมน้ำของเซลล์ประสาทหรือเนื้อเยื่อสนับสนุนรอบเซลล์, การเสื่อมสภาพ และการตายของเซลล์สมอง.

เนื้อเยื่อสมอง พบมีลักษณะ VACUOLIZATION ในบริเวณ CEREBELLUM ส่วน WHITE MATTER และใน CEREBRUM, โดยไม่พบมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการอักเสบในบริเวณรอบๆ และพบในสัตว์ทดลองทุกตัว. ดังนั้น น่าจะสรุปว่า สิ่งที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการตรึงสภาพ (FIX) เนื้อสมองไม่ดีพอ.

ต่อมไทมัส

ไม่แสดงความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ.

หัวใจ

ไม่แสดงความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ, ยกเว้นหนูเพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม SATELLITE กลุ่มละ 1 ตัวเท่านั้นที่พบมี MILD ACUTE & CHRONIC MYOSITIS.

ปอด

เนื้อเยื่อที่ได้รับไม่ได้เป็นตัวแทนจาก 5 main lobe ของปอด พบว่า หนูทดลองในทุกกลุ่มแสดงลักษณะพยาธิสภาพของ interstitial pneumonia ในปอด, ซึ่งลักษณะที่เห็นน่าจะเกิดจากการติดเชื้อมากกว่าผลจากสารเคมี/สมุนไพร.

ตับ

พบมีการ proliferation ของ bile ducts และ bile ductules และมี fibrosis เพิ่มขึ้น แต่ไม่มาก ในบริเวณ Portal area, ลักษณะที่พบไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในทั้งสองเพศ.

ตับอ่อน

หนูทดลองจากทุกกลุ่มทุกเพศไม่แสดงความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ.

ม้าม

หนูทดลองจากทุกกลุ่มทุกเพศไม่แสดงความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ.

ไต

พบลักษณะ DILATED TUBULES และ REGENERATING TUBULES ในหนู 1-2 ตัวของทุกกลุ่มการทดลอง. ในหนูเพศเมียทุกกลุ่ม พบมีการสะสมสารคล้ายผลึกแคลเซียม (CALCINOSIS) ในท่อไตเป็นหย่อมขนาดเล็ก และพบ GRANULATION TISSUE ที่มีเม็ดเลือดขาวชนิด LYMPHOCYTE แทรกอยู่เห็นเป็นกลุ่มเล็กๆ ในบริเวณ COLLECTING TUBULE ในหนู 1-2 ตัวจากกลุ่มทดลอง. อย่างไรก็ตาม LESION ที่กล่าวมา พบทั้งในกลุ่มที่ทดลองและกลุ่มควบคุม, โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่มากและใกล้เคียงกัน จึงไม่น่าจะเป็นผลจากการได้รับสารเคมี/สมุนไพร.

ต่อมหมวกไต

หนูจากทุกกลุ่มทุกเพศไม่แสดงความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ, นอกจากพบมี GRANULOMA ที่ชั้น SUBCAPSULAR ของ ADRENAL GLAND ในหนู 1 ตัว และพบ PSEUDOCYST ที่บริเวณ CORTEX ของต่อมในหนูอีก 1 ตัว, ซึ่งลักษณะที่พบนี้ไม่ได้เป็นผลจากการได้รับสารเคมี/สมุนไพร, แต่น่าจะเกิดจากความผิดปกติในตัวหนูเองมากกว่า.

กระเพาะอาหาร

หนูทดลองจากทุกกลุ่มทุกเพศไม่แสดงความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ.

ลำไส้เล็กส่วน DUODENUM, JEJUNUM และ IIEUM

หนูทดลองจากทุกกลุ่มทุกเพศไม่แสดงความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ.

ลำไส้ใหญ่ส่วน CECUM

หนูทดลองจากทุกกลุ่มทุกเพศไม่แสดงความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ.

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ.

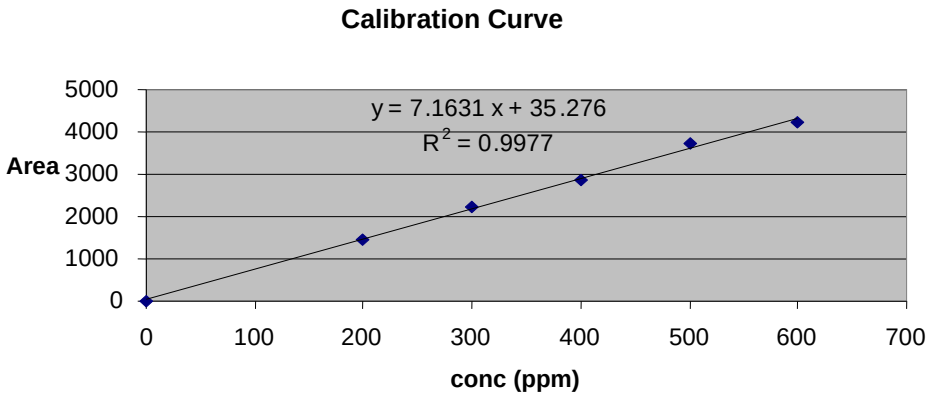
อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบ.

3.12 การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

3.12.1 ด้านเคมี

ในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ใช้สารกลุ่ม diterpene alcohol, ซึ่งมีสูตรใกล้เคียงกับสาร plaunotol เป็น marker. ในแต่ละแคปซูลจะมีปริมาณสารกลุ่ม marker ประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 21 มิลลิกรัม) และจากการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุกเดือนเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าปริมาณ marker ของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์. โดยปริมาณ marker จะลดลงไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์, ทำให้คาดคะเนได้ว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันสามารถเก็บได้นานประมาณ 2 ปี.



รูปที่ 11. กราฟมาตรฐานสารสกัดเปล้าตะวัน.

ตารางที่ 34. ผลการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันที่ระยะเวลาเก็บรักษา 6 เดือน

ระยะเวลา	% สารสกัดเปล้าแดง		
	T(RT)	T(40)	T(45)
T_0 (เดือนธันวาคม)	14.982 [a]	-	-
T_1 (เดือนมกราคม)	14.397 [b]	14.225 [a]	14.381 [a]
T_2 (เดือนกุมภาพันธ์)	14.812 [ab]	14.845 [ab]	14.830 [b]
T_3 (เดือนมีนาคม)	13.116 [a]	14.553 [b]	14.740 [ab]
T_4 (เดือนเมษายน)	14.580 [ab]	14.634 [ab]	14.704 [ab]
T_5 (เดือนพฤษภาคม)	14.369 [ab]	14.294 [ab]	14.216 [ab]
T_6 (เดือนมิถุนายน)	14.471 [ab]	14.514 [ab]	14.369 [ab]
% ลดลง T1-T6	3.4	3.12	4.09

3.12.2 ด้านจุลชีววิทยา

จากการผลิตผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 2 ล็อต ได้นำมาตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน กระทรวงสาธารณสุข (2543), ได้ผลดังตารางที่ 35.

ตารางที่ 35. ผลการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน

ตัวอย่างทดสอบ	จำนวนจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างทดสอบจำนวน 1 กรัม				จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในตัวอย่างทดสอบจำนวน 10 กรัม	
	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนี/กรัม)	จำนวนยีสต์และรา (โคโลนี/กรัม)	จำนวน *E.coli* (โคโลนี/กรัม)	จำนวน Entero-Bacterias (โคโลนี/กรัม)	*Clostridium* Spp.	*Salmonella* spp.
ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ล๊อต 530426	0	0	0	0	ไม่พบ	ไม่พบ
ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ล๊อต 540117	0	0	0	น้อยกว่า 1	ไม่พบ	ไม่พบ
กระทรวงสาธารณสุข (2543)	5×10^{7}	5×10^{3}	5×10^{2}	5×10^{4}	ไม่พบ	ไม่พบ

3.13 การทดสอบทางคลินิกระยะที่หนึ่งในมนุษย์ (สุโนภักดิ์ และอยู่สบาย 2555)

3.13.1 ลักษณะทั่วไปของประชากร

อาสาสมัครที่คาดว่าสามารถร่วมโครงการได้ (potential subjects) มีทั้งหมด 21 คน. หลังจากการตรวจคัดกรอง, การซักประวัติ, การตรวจร่างกาย และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการตามเกณฑ์, พบว่า อาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์เข้าร่วมโครงการ (inclusion criteria) ทั้งหมด 21 คน มีผู้ที่ออกจากโครงการวิจัย 1 คน. อาสาสมัครที่ออกจากโครงการวิจัย เนื่องจากก่อนรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน อาสาสมัครได้กลิ่นเหม็นเขียวของยา, อาสาสมัครมีอาการคลื่นไส้ แต่ไม่อาเจียน, เป็นอย่างนี้ทุกครั้งเวลารับประทานผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 3 วัน, จึงขอออกจากโครงการวิจัย. หลังจากออกจากโครงการวิจัย, มีการติดตามผลคือ อาสาสมัครไม่ได้รับประทานยา, ไม่อาการคลื่นไส้และผลการตรวจร่างกาย, การตรวจทางห้องปฏิบัติการ, อาสาสมัครปกติดี.

ตารางที่ 36. ผลการตรวจสัญญาณชีพ น้ำหนักตัวและดัชนีมวลกายของอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
น้ำหนัก (กก.)						
รวม	63.30±13.72	63.25±13.65	63.20±13.75	63.20±13.82	63.10±13.66	63.20±13.61
ดัชนีมวลกาย (กก./ม^2)						
รวม	23.87±5.26	23.86±5.23	23.87±5.20	23.81±5.32	23.76±5.21	23.74±5.15
ความดันโลหิต (บน) (มม./ปรอท)						
รวม	118.00±11.52	118.50±8.75	117.50±8.51	119.00±10.71	118.50±10.40	112.55±25.93
ความดันโลหิต (ล่าง) (มม./ปรอท)						
รวม	78.50±7.45	78.50±5.87	76.50±5.87	78.50±5.87	80.00±6.49	79.50±6.86
อัตราชีพจร (ครั้ง/นาที)						
รวม	69.10±4.83	69.30±3.33	71.30±3.33	70.00±3.55	70.80±3.86	71.00±3.46
อัตราการหายใจ (ครั้ง/นาที)						
รวม	17.30±1.17	16.60±0.94	16.80±1.01	17.00±1.03	16.80±1.01	16.90±1.02

3.13.2 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.13.2.1 ผลของการตรวจคลื่นหัวใจ พบว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันไม่มีผลเปลี่ยนแปลงคลื่นหัวใจหลังจากอาสาสมัครได้รับผลิตภัณฑ์นาน 28 วัน.

3.13.2.2 ผลของการตรวจปอดด้วยการเอกซเรย์ ไม่พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากอาสาสมัครได้รับผลิตภัณฑ์นาน 28 วัน.

3.13.2.3 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.13.2.3.1 ผลการตรวจค่าโลหิตจากการคัดกรองอาสาสมัคร

- VDRL อาสาสมัครทุกคนให้ผล Non-reactive.
- Anti-HIV อาสาสมัครทุกคนให้ผล Non-reactive.
- G6PD อาสาสมัครทุกคนให้ผล Non-reactive.

3.13.2.3.2 ผลการตรวจทางเคมีคลินิกของอาสาสมัคร

1. ผลการตรวจโปรตีนในเลือด ได้แก่ total protein และ globulin และการตรวจระดับ direct bilirubin, total bilirubin อยู่ในเกณฑ์ปกติ, พบว่า ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ, ตามตารางที่ 37.

ตารางที่ 37. ผลการตรวจการทำงานของตับ (liver function test) ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
Total protein (6.4-8.3 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	7.79±0.52	7.58±0.25	7.52±0.34	7.59±0.33	7.59±0.25	7.53±0.26
Albumin(3.5-5.0 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	4.33±0.28	4.30±0.18	4.29±0.20	4.33±0.23	4.29±0.20	4.25±0.23
Globulin (1.5-3.5 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	3.46±0.37	3.29±0.21	3.23±0.25	3.25±0.24	3.31±0.24	3.28±0.18
Total bilirubin (0.3-1.2 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	0.73±0.42	0.72±0.27	0.74±0.32	0.75±0.24	0.73±0.36	0.79±0.22
Direct bilirubin (0-0.2 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	0.16±0.09	0.15±0.06	0.16±0.07	0.17±0.07	0.16±0.09	0.17±0.06

2. ผลการตรวจเอนไซม์การทำงานของ ตับ (liver function) ทั้งนี้ได้แยกผลการตรวจออกเป็น 3 กลุ่ม.

ก) ผลการตรวจระดับเอนไซม์ที่ใช้ในการทำงานของเซลล์ตับ ได้แก่ aspairate aminotransferase (AST), เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), พบว่า ระดับของเอนไซม์ AST, ALT ของอาสาสมัครสูงขึ้นใน D_{21} อย่างมีนัยสำคัญ และหลังจากหยุดยา ระดับ AST, ALT ลดลง, รายละเอียดปรากฏในตารางที่ 38.

ตารางที่ 38. ผลการตรวจระดับเอนไซม์การทำงานของเซลล์ตับ n=20 ของอาสาสมัครทั้งหมด ใน อาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
AST (0-50 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	21.45±6.25	19.60±3.23	22.20±6.37	27.35±18.09	52.00±57.17	44.00±43.05
ALT (0-45 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	18.05±8.83	16.40±6.77	19.75±9.93	36.70±58.82	84.05±119.47	77.75±98.55
ALP (30-120 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	61.20±17.91	63.20±15.05	65.40±16.48	66.85±13.41	63.25±17.29	70.55±19.21

หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดง mean±SD *สถิติ Repeated ANOVA เปรียบเทียบจากก่อนกินยาอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$)

ข) ผลการตรวจเอนไซม์การทำงานของตับ aspairate amino-transferase (AST), เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), n = 13 (ของอาสาสมัครที่ระดับเอนไซม์ตับปกติ), พบว่า ระดับของเอนไซม์ AST, ALT และ ALP ของอาสาสมัครไม่พบความเปลี่ยนแปลงจากเดิม, รายละเอียดปรากฏในตารางที่ 39.

ตารางที่ 39. ผลการตรวจระดับเอนไซม์การทำงานของเซลล์ตับ n=13 ของอาสาสมัครที่ระดับเอนไซม์ตับปกติ ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
AST (0-50 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	22.23±5.88	20.15±3.53	22.69±7.55	20.69±6.10	21.23±6.80	22.62±6.31
ALT (0-45 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	19.62±9.70	17.15±7.98	19.62±11.00	17.62±10.25	19.15±12.99	22.62±10.77
ALP (30-120 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	60.85±21.11	63.46±18.45	65.69±20.37	66.00±15.66	62.08±20.41	68.38±22.61

ค) ผลการตรวจเอนไซม์การทำงานของตับ ได้แก่ aspairate aminotransferase (AST), เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), n = 7 (กลุ่มอาสาสมัครที่ค่าเอนไซม์การทำงานของตับเพิ่มขึ้น), การตรวจเอนไซม์การทำงานของตับ, พบว่า ระดับของเอนไซม์ AST, ALT ของอาสาสมัครพบผลการตรวจการทำงานของตับสูงขึ้น ใน D_{21}, D_{28} (หยุดรับประทาน) จนถึง D_{35}, รายละเอียดปรากฏในตารางที่ 40.

ตารางที่ 40. ผลการตรวจระดับเอนไซม์การทำงานของเซลล์ตับ n=7 (มีแนวโน้มการทำงานของเอนไซม์การทำงานของตับเพิ่มขึ้น) ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
AST (0-50 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	20.00±7.14	18.57±2.51	21.29±3.59	39.71±26.22	109.14±66.30	83.71±54.38
ALT (0-45 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	15.14±6.59	15.00±3.79	20.00±8.37	72.14±92.14	204.57±137.08	180.14±108.20
ALP (30-120 ยูนิต/ลิตร)						
รวม	61.86±11.14	62.71±6.02	64.86±5.46	68.43±8.64	65.43±10.24	74.57±10.80

หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดง mean±SD *สถิติ Repeated ANOVA เปรียบเทียบจากก่อนกินยาอย่างมีนัยสำคัญ (P< 0.05)

3. ผลการตรวจการทำงานของไต (renal function)

ผลการตรวจการทำงานของไต ได้แก่ BUN, creatinine และการตรวจปัสสาวะ (urineanalysis: U/A) พบว่า อาสาสมัครหลังรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันครบ 28 วัน มีระดับ BUN, Creatinine และการตรวจปัสสาวะ (urineanalysis: U/A) อยู่ในเกณฑ์ปกติ, พบว่า ไม่พบความเปลี่ยนแปลงจากก่อนรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันอย่างมีนัยสำคัญ, รายละเอียดดังตารางที่ 41.

ตารางที่ 41. ผลการตรวจการทำงานของไต ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
BUN (7.9-20.1 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	11.37±2.92	11.65±3.45	11.64±3.37	11.33±3.00	10.61±1.75	10.96±2.64
Creatinine (0.9-1.3 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	0.98±0.16	1.01±0.23	1.00±0.21	1.02±0.21	1.01±0.18	0.98±0.17
Urine analysis Specific gravity						
รวม	0.98±0.23	0.97±0.23	1.02±0.01	0.97±0.23	1.02±0.01	1.02±0.01
Urine analysis pH (4.5-8.0)						
รวม	5.65±1.40	5.75±1.50	5.95±0.63	5.73±1.47	6.10±0.53	6.13±0.63

4. การตรวจทางโลหิตวิทยา (hematology)

ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา (hematology) ได้แก่ การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาว white blood cell count (WBC), การนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cell differentiation) ประกอบด้วย neutrophil, monocyte, lymphocyte, การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดง red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct.), platelet count, พบว่าปริมาณ monocyte เพิ่มขึ้นใน D_{14} และลดลงเล็กน้อยใน D_{21} และ D_{28} แต่อยู่ในเกณฑ์ปกติ, รายละเอียดดังตารางที่ 42.

ตารางที่ 42. ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
WBC (4.0-11.0 K/cumm.)						
รวม	6.56±1.17	6.63±1.67	6.79±0.92	6.47±0.81	6.54±1.04	6.69±1.48
Neutrophil (45-75%)						
รวม	59.10±7.44	58.70±7.28	57.63±8.14	58.89±7.30	57.51±8.93	55.95±9.74
Lymphocyte (30-120u/l)						
รวม	33.51±6.61	33.50±6.96	33.29±7.77	31.49±6.51	33.05±7.29	34.79±9.14
Monocyte (2-10%)						
รวม	3.97±0.36	4.08±0.30	4.94±0.49	4.75±0.37	4.42±0.37	4.71±0.37
Red blood cell (4.50-6.00)						
รวม	4.95±0.52	4.96±0.49	4.98±0.52	4.97±0.54	4.97±0.47	4.96±0.52
Hb (12.0-16.0x10^6 /cumm.)						
รวม	14.16±1.86	14.16±1.54	14.22±1.66	14.18±1.73	14.29±1.53	14.23±1.67
Hct (36-48 %)						
รวม	41.20±4.90	40.49±5.17	41.41±4.61	41.24±4.80	41.51±4.26	41.36±4.38
Platelet count. (150-400 K/cumm.)						
รวม	266.85±46.50	264.30±58.50	262.45±48.21	256.85±41.35	263.80±43.98	259.75±44.30

5. การตรวจระดับไขมัน

ผลการตรวจระดับไขมัน total cholesterol, triglyceride, HDL-Choles-terol และ LDL-cholesterol พบว่า ไม่พบความเปลี่ยนแปลงจากก่อนรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันอย่างมีนัยสำคัญ, รายละเอียดดังตารางที่ 43.

ตารางที่ 43. ผลการตรวจระดับไขมันในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
Total Cholesterol (0-200 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	208.10±33.08	206.80±42.26	206.25±33.93	208.80±45.40	204.25±39.19	206.15±41.22
Triglyceride (0-150 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	93.50±47.95	95.50±44.32	100.10±54.27	94.05±50.40	83.85±39.45	93.10±40.04
HDL-Cholesterol (35-60 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	52.15±7.07	51.50±9.06	52.45±7.58	52.05±6.92	52.15±6.46	52.65±8.64
LDL-Cholesterol (0-100 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
รวม	127.00±28.06	130.30±32.90	131.80±26.32	135.60±37.68	128.95±32.73	132.30±34.31

6. การตรวจระดับของ CD4, CD8 และ CD4:CD8 ratio

ผลการตรวจนับระดับการทำงานของ CD4, CD8 และ CD4:CD8 ratio พบว่า ไม่พบความเปลี่ยนแปลงจากก่อนรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันอย่างมีนัยสำคัญ, รายละเอียดดังตารางที่ 44.

ตารางที่ 44. ผลการตรวจระดับของ CD4, CD8 และ CD4:CD8 ratio ในอาสาสมัครปกติที่ได้รับยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 650 มิลลิกรัม นาน 28 วัน

รายการ	ก่อนกิน	ระหว่างกิน				หยุดกิน
	D_0	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}	D_{35}
CD4 (410-1590 เซลล์/ยูนิตลิตร)						
รวม	744.00±152.20	768.90±222.91	761.15±188.83	703.40±192.93	703.90±222.01	784.40±234.76
CD8 (190-1140 เซลล์/ยูนิตลิตร)						
รวม	590.90±231.57	585.30±240.40	597.85±227.77	533.30±179.83	559.30±204.21	604.25±195.81
CD4:CD8 ratio(0.65-2.49)						
รวม	1.44±0.65	1.44±0.56	1.42±0.59	1.45±0.58	1.38±0.57	1.42±0.62

3.13.2.4 ผลการซักประวัติและการตรวจร่างกาย

อาสาสมัครที่ร่วมโครงการมีทั้งหมด 20 คน โดยได้รับประทานยาเม็ดแคปซูลผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในปริมาณ 650 มิลลิกรัม ได้รับการซักประวัติและตรวจร่างกายโดยแพทย์แผนปัจจุบันและแพทย์แผนไทยประยุกต์, ระหว่างรับประทานยา, ติดตามอาการและอาการแสดงของอาสาสมัครทั้งหมด 5 ครั้ง คือ D_7, D_{14}, D_{21}, D_{28} จากนั้นหยุดรับประทานยาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และติดตามอาการ อาการแสดงของอาสาสมัครครั้งสุดท้าย D_{35}.

การติดตามอาสาสมัครมาตามนัดครบทั้ง 20 ราย ครั้งที่ 1 (D_7) โดยวัดความดันโลหิต, อัตราชีพจร และอัตราการหายใจ, ชั่งน้ำหนัก, พบว่า อาสาสมัครจำนวน 2 ราย หลังจากรับประทานยามีอาการถ่ายอุจจาระ 2–3 ครั้ง/วัน ในช่วง 2–3 วันแรก โดยไม่มีอาการถ่ายปนมูก, ไม่มีเลือด, ไม่มีอาการไข้ท้องเสีย, ไม่มีอาการคลื่นไส้, อาเจียน, ตรวจร่างกายไม่พบความผิดปกติ, ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ที่ปกติ.

การติดตามอาสาสมัครมาตามนัดครบทั้ง 20 ราย ครั้งที่ 2 (D_{14}), มีอาสาสมัคร จำนวน 1 ราย ได้แจ้งผู้วิจัยว่า เป็นไข้หวัด, ได้ไปพบแพทย์ และได้รับประทานยาแก้ปวดและยาแก้อักเสบควบคู่กับการรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน เป็นเวลา 3 วัน. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ที่ปกติ.

การติดตามอาสาสมัครมาตามนัดครบทั้ง 20 ราย ครั้งที่ 3 (D_{21}), มีอาสาสมัครจำนวน 1 ราย ได้แจ้งผู้วิจัยว่า ได้รับการเสริมจมูก และได้รับประทานยาแก้ปวดและยาแก้อักเสบ เป็นเวลา 5 วัน. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ที่ปกติ.

การติดตามอาสาสมัครมาตามนัดครบทั้ง 20 ราย ครั้งที่ 4 (D_{28}), มีอาสาสมัครจำนวน 1 ราย ท้องเสียโดยไม่ทราบสาเหตุ, หยุดรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน 1 วัน.

การติดตามอาสาสมัครมาตามนัดครบทั้ง 20 ราย ครั้งที่ 5 (D_{35}), จากอาสาสมัครจำนวน 7 ราย ที่มีค่าผลการตรวจเอนไซม์การทำงานของเซลล์ตับ ได้แก่ aspairate aminotransferase (AST), เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP). ทางผู้วิจัยได้ทำการติดตามอาสาสมัครอย่างต่อเนื่องและซักประวัติอย่างละเอียด หลังพบการเปลี่ยนแปลงจากการสอบถามอาสาสมัครทั้ง 7 ราย, ไม่ได้ทำการใดอันมีข้อบ่งชี้ว่า น่าจะทำให้เอนไซม์การทำงานของเซลล์ตับเพิ่มสูงขึ้น. ผู้วิจัยได้ทำการตรวจร่างกายและตรวจทางห้องปฏิบัติการจนอาสาสมัครมีค่าระดับเอนไซม์ของเซลล์ตับอยู่ในเกณฑ์ที่ปกติ.

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สมุนไพรพุงทะลายและสารสกัดเปล้าตะวันมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง, จึงได้สนใจนำพืชทั้งสองชนิดนี้มาศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ช่วยปรับสมดุลร่างกายให้ผู้ป่วยเอดส์มีภูมิคุ้มกันดีขึ้น. คณะผู้วิจัยได้ทดลองศึกษาหลายวิธีการทดลอง ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง. แต่นำมารายงานเฉพาะในส่วนที่สำคัญและเห็นผลชัดเจนต่อการเป็นผลิตภัณฑ์ปรับสมดุล. งานวิจัยในรายงานนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในสัตว์ทดลองที่ได้รับสาร cyclophosphamide และ cyclosporine A เป็นสารกดภูมิคุ้มกัน เพื่อเป็นการจำลองลักษณะภูมิคุ้มกันบกพร่องของผู้ป่วยเอดส์และศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทั้งแบบสารน้ำ (humoral immunity response) และแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immune response). โดยสารทดสอบทั้งสองชนิดผ่านการทดสอบความเป็นพิษและพบว่า มีค่า LD_{50} มากกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม.

การทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายประกอบด้วย 3 ระยะ คือ resting phase, active phase และ effector phase. สมุนไพรหลายชนิดที่มีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์มักมีผลต่อเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันตั้งแต่ในระยะ resting phase. โดยมักพบว่า มีกลไกจับกับตัวรับในกลุ่มที่เรียกว่า toll-like receptors (TLR), โดยเฉพาะ TLR4 ที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์เมมเบรน. ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายหลังการเกิดปฏิสัมพันธ์ดังกล่าว มักนำไปสู่การเพิ่มการทำงานภายในนิวเคลียสหรือการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนในท้ายที่สุด. ดังจะเห็นว่า การเพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกันในลักษณะนี้ไม่ได้เกิดขึ้นภายใต้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ, จึงเรียกผลการตอบสนองเช่นนี้ว่า mitogenic activity (Janeway *et al*. 2005).

สมุนไพรพุงทะลายประกอบด้วยกัมพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นสายพันธะชนิดบีตาและแอลฟา (Pantipa *et al*. 2006). จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า มีผลต่อการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน (Piyarat *et al*. 2005) และสามารถเพิ่มการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง (Naowarat *et al*. 2007). โดยผลการทดลองดังกล่าว เป็นการให้สมุนไพรพุงทะลายก่อนการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน. ผลดังกล่าวนั้น อาจเกิดจาก mitogenic effect ของสารต่อเซลล์ในระยะ resting phase หรือเป็นผลจากปฏิสัมพันธ์กับตัวรับอื่นๆ ใน signaling cascade ที่เกิดขึ้นในระยะ active phase หรือ effector phase. ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวภายหลังการให้สมุนไพรพุงทะลายต่อเนื่อง 7 วัน, ซึ่งพบว่า สมุนไพรพุงทะลายมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ. สมุนไพรพุงทะลายในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีฤทธิ์เป็น mitogenic activity โดย

สามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดได้เท่ากับ 42.3%. ในขณะที่สารสกัดเปล้าตะวันไม่ได้แสดงฤทธิ์ mitogenic effect และมิได้มีผลเพิ่มการออกฤทธิ์ของสมุนไพรพุงทะลาย. แต่เมื่อศึกษาเบื้องต้น (preliminary test) โดยให้สารสกัดเปล้าตะวันในสภาวะที่มีการกดภูมิคุ้มกัน, กลับแสดงให้เห็นแนวโน้มของการเพิ่มเม็ดเลือดขาวได้ และได้นำมาศึกษาต่อโดยวิธี haemagglutination antibody test พบว่าการให้สารสกัดเปล้าตะวันภายหลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเม็ดเลือดแดงแกะติดต่อกัน 7 วัน สามารถช่วยเพิ่มปริมาณแอนติบอดีในสภาวะที่มีการกดภูมิคุ้มกัน, ซึ่งอาจเป็นผลจากการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในระยะ active phase หรือ effector phase ของการตอบสนองแบบจำเพาะ. ในกรณีผู้ที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกัน เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์, จะมีปริมาณของ CD4 T lymphocyte ลดต่ำลง, เป็นผลให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในแบบพึ่งเซลล์และแบบสารน้ำบกพร่องไป, ก่อให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ ได้ง่าย. ในหลายกรณียังพบว่า เมื่อให้การรักษาจนระดับของ CD4 T lymphocyte เพิ่มขึ้นได้, แต่เซลล์ภูมิคุ้มกันยังคงมีความบกพร่องในการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน (Vigano *et al*. 2008). ดังนั้น สารเสริมภูมิคุ้มกันอาจเป็นประโยชน์ในการช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยเหล่านี้ทำงานได้เป็นปกติเร็วขึ้น.

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแบบจำเพาะ (specific immunity) แบ่งแยกออกได้ 2 ลักษณะ คือ แบบสารน้ำ (humoral immune responses) ซึ่งมี B lymphocyte ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี และแบบพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immune responses) ซึ่ง T lymphocyte มีบทบาทสำคัญ และยังมีผลต่อการตอบสนองแบบสารน้ำด้วย, โดยเฉพาะการตอบสนองต่อ T-dependent antigen, เม็ดเลือดแดงแกะเป็น T-dependent antigen, ซึ่งจากการทดลอง heamagglutination antibody test พบว่า สารสกัดเปล้าตะวันสามารถช่วยเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในแบบสารน้ำ, ทำให้เพิ่มปริมาณการสร้างแอนติบอดีได้. โดยสารสกัดเปล้าตะวันในขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายในสภาวะที่ถูกกดภูมิคุ้มกันด้วยยา cyclophosphamide. หลังจากนั้น จึงทำการศึกษาต่อเพื่อพิสูจน์ว่า สารสกัดเปล้าตะวันมีผลต่อการเพิ่มการตอบสนองแบบพึ่งเซลล์หรือไม่ ด้วยวิธี delayed-type hypersensitivity test (DTH). โดยทำการกดภูมิคุ้มกันหนูทดลองด้วยยา cyclosporin A, ซึ่งเป็น cyclic polypeptide ประกอบด้วยกรดแอมิโน 11 ชนิด. โดยยาจะยับยั้งการสร้างและการทำงานของ T lymphocyte ด้วยกลไกต่างๆเช่น ระงับการสร้างและการปล่อย interleukin 2 หรือ T cell growth factor. การวัดปฏิกิริยา delayed-type hypersensitivity reaction เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประเมินการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแบบ cell-mediated immune responses ในสัตว์ทดลองได้. โดยอาจเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบนี้บนอุ้งเท้าหนูทดลองด้วยสาร ovalbumin. การเกิดปฏิกิริยา DTH อาจแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะ, คือ sensitization เป็นช่วงเวลาที่ร่างกายได้รับแอนติเจนเป็นครั้งแรก และ elicitation เป็นช่วงเวลาที่ร่างกายได้รับแอนติเจนที่มี

ความจำเพาะซ้ำอีกครั้ง เป็นผลให้ CD4 T lymphocyte นั้นถูกกระตุ้น แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบอย่างเด่นชัดภายหลัง 24 ชั่วโมง. ยา cyclosporin A ที่ให้ก่อนการฉีด ovalbumin ในระยะ sensitization จะทำการยับยั้งการทำงานและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte และเป็นผลให้การตอบสนองของ T lymphocyte ที่มีต่อ ovalbumin ในระยะ elicitation ลดน้อยลงอย่างเด่นชัด. จากผลการทดลอง พบว่า การให้สารสกัดเปล้าตะวันมีการตอบสนองของปฏิกิริยา DTH ในหนูที่ได้รับยา cyclosporin A เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม.

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเปล้าตะวันต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ในสภาวะที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกันเพิ่มเติม โดยใช้วิธีการทดลอง cytokine production ex vivo model ที่ได้พัฒนาจากแบบของ Sun, Song and Hu (2004), Ryng *et al*. (2005) และ Akiyama *et al*. (2004). ยา cyclosporin A เป็นยากดภูมิคุ้มกันที่ออกฤทธิ์โดยตรงต่อการทำงานของ T lymphocyte, ทำให้มีการยับยั้งการสร้างไซโทไคน์ชนิด IL-2. ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ม้ามของหนูกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันปกติจะสนองตอบต่อการกระตุ้นของ ovalbumin ในระดับที่มากกว่าเซลล์ม้ามจากกลุ่มที่ได้รับ cyclosporin A. แสดงให้เห็นว่า ในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกันปริมาณของ T lymphocyte ที่จำเพาะต่อ ovalbumin มีน้อยลงหรือความสามารถในการทำงานของเซลล์ดังกล่าวลดน้อยลง. การให้สารสกัดสมุนไพรเปล้าตะวันในหนูทดลองขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า เซลล์ม้ามจากหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกันและได้รับสารสกัดดังกล่าวจะมีการตอบสนองต่อแอนติเจน โดยการสร้าง IL-2 เพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์ม้ามของหนูที่มิได้รับสารสกัดใดๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ. แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเปล้าตะวันช่วยให้ปริมาณเซลล์ T lymphocyte ที่จำเพาะต่อ ovalbumin มีเพิ่มขึ้น หรือมีความสามารถในการทำงานเพิ่มขึ้นได้. จึงสรุปว่าสารสกัดเปล้าตะวันที่ระดับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีฤทธิ์เพิ่มภูมิคุ้มกัน ทั้งในแบบสารน้ำและแบบพึ่งเซลล์ได้ในสัตว์ทดลองที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง.

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากพืชที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่า พุงทะลายขนาด 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองปกติได้ดี. จึงได้ทดลองเตรียมแกรนูลที่มีส่วนประกอบของสารสกัดเปล้าตะวันและพุงทะลายในอัตราส่วน 300:15, นำไปทดสอบค่าความเป็นพิษ พบว่า มีค่า LD_{50} มากกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในหนู wistar rat. คำนวณค่า human equivalent dose รวมทั้ง safety factor, นำไปผลิตเป็นแคปซูลเปล้าตะวันที่มีส่วนประกอบของสารสกัดเปล้าตะวันแคปซูลละ 150 มิลลิกรัม และพุงทะลายแคปซูลละ 7.5 มิลลิกรัม. ผลิตภัณฑ์นี้นำไปทดสอบความปลอดภัยเพิ่มเติม โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ตับชนิด HEPG2 โดยวิธี MTT พบว่า ผลิตภัณฑ์นี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตับที่ขนาดไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีเซลล์รอดชีวิต

ที่ปริมาณ 67%. เมื่อนำผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันไปทดสอบความเป็นพิษในระดับโครโมโซม ตามวิธีทดสอบ OECD (1997), โดยใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, เพศละ 5 ตัว และได้รับการป้อนผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันทางปากในขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว. หลังจากป้อนไปแล้ว 24 ชั่วโมง, หนูทุกตัวจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบและเก็บเซลล์ไขกระดูกจากกระดูกต้นขา เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์โครโมโซม. ผลของการทดสอบพบว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในขนาดที่หนูได้รับมีผลทำให้ค่า % Mitotic Index ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ซึ่งบ่งชี้ว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันอาจมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ไขกระดูก เมื่อได้รับในปริมาณสูงภายในครั้งเดียว, แต่ไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อโครโมโซมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. สรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน ขนาด 15,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ไม่มีผลทำให้โครโมโซมเสียหาย และเนื่องจาก ผลิตภัณฑ์นี้จุดมุ่งหมายที่จะช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้แก่ผู้ป่วยเอดส์, จึงน่าที่จะได้รับยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลาพอสมควร. จึงได้ทำการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังในสัตว์ทดลองเป็นเวลา 3 เดือน ตาม OECD (1998). จากการสังเกตอาการทางพิษวิทยา, ชั่งน้ำหนักหนูทดลอง, ชั่งน้ำหนักอาหารที่ให้หนูทดลอง, ตรวจผลเคมีคลินิกของเลือด, ตรวจค่าโลหิตวิทยา, ชั่งน้ำหนักอวัยวะภายใน และตรวจเนื้อเยื่อพยาธิวิทยา, ไม่พบความผิดปกติที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม. สรุปได้ว่า หนูขาวพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเปล้าตะวันทางปาก ขนาด 100, 500 และ 2,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ติดต่อกันนาน 90 วัน, ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรัง.

การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของผลิตภัณฑ์ พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ขนาด 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ให้ผลในการกระตุ้น T-lymphocyte ให้สร้าง IL-2 เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม. นอกจากฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้ว ยังได้ศึกษาฤทธิ์ในการปรับสมดุลร่างกาย, ซึ่งช่วยกระตุ้นระบบอื่นๆ ได้แก่ ฤทธิ์การคลายกังวล, ฤทธิ์ลดไข้ และฤทธิ์การต้านอักเสบของผลิตภัณฑ์, พบว่าผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันที่ขนาด 650 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว แสดงแนวโน้มในการลดอาการวิตกกังวลในหนูทดลอง, โดยแสดงฤทธิ์ไปในทิศทางเดียวกับสารมาตรฐาน phenobarbital ในการทดสอบ light/dark Task. ผลการศึกษาฤทธิ์ในการลดไข้ด้วยวิธี brewer yeast induced- pyrexia test พบว่าผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันที่ขนาด 650 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว แสดงแนวโน้มในการลดอาการวิตกกังวลในหนูทดลอง โดยแสดงฤทธิ์ไปในทิศทางเดียวกับสารมาตรฐาน phenobarbital. ในส่วนการศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบด้วยวิธี Rat Paw Edema นั้น พบว่าการให้ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันด้วยวิธีการกินในขนาด 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของอุ้งเท้า 1 ชั่วโมง, มีผลต้านการอักเสบของอุ้งเท้าหนูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม. คำนวณสถิติด้วยวิธี oneway ANOVA, โดยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-3, คิดเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งการอักเสบได้เท่ากับ 45.6, 34.1 และ 37.5, ตามลำดับ.

ในส่วนของการควบคุมคุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์นั้น ทำการศึกษาสารที่จะใช้เป็น marker ในการติดตามผล, ได้แก่ สาร diterpene alcohol, ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร plaunotol ในเปล้าตะวัน , พบว่า ในแต่ละแคปซูลจะมีสารนี้ประมาณ 14%. ผลจากการติดตามสารตัวนี้เป็นระยะเวลา 6 เดือน ที่ 3 ระดับอุณหภูมิ, พบว่า ปริมาณสารนี้ลดลงไม่เกิน 5%. ทำให้คาดคะเนจากการศึกษาอายุการเก็บรักษา โดยการทดสอบแบบเร่งได้ว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันจะมีอายุการเก็บรักษามากกวา 2 ปี. ทางด้านจุลชีววิทยา ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรตามวิธีที่กำหนดในกระทรวงสาธารณสุข (2543) พบว่า มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานดังกล่าวทั้ง 2 ล็อตการผลิต.

จากการทดสอบทั้งหมดข้างต้น ทำให้ได้ผลการศึกษาทางพรีคลินิกหรือก่อนคลินิก เพื่อที่จะได้ให้ความมั่นใจในการศึกษาทางคลินิกต่อไป. การศึกษาทางคลินิกจะทำใน 2 เฟส คือ เฟสแรกเป็นการศึกษาในอาสาสมัครที่ร่างกายปกติ เพื่อประเมินความปลอดภัยในมนุษย์. เมื่อผ่านเฟสแรกแล้ว จะทำการศึกษาในเฟสที่ 2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในผู้ป่วย. จากการศึกษาเฟสแรก มีอาสาสมัครที่ผ่านเข้าร่วมโครงการทั้งสิ้น 21 คน, โดยมีอาสาสมัคร 1 คน ได้ขอออกจากโครงการ, เนื่องจาก หลังรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันไป ใน 3 วันแรก มีอาการเหม็นเขียว, คลื่นไส้, แต่ไม่อาเจียน, ไม่มีอาการอย่างอื่นร่วม, จึงขอออกจากโครงการ. ทางผู้วิจัยเห็นว่า อาการที่อาสาสมัครเป็นนั้น น่าจะมาจากกลิ่นของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน. ดังนั้นจึงเหลืออาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ 20 คน, โดยทุกคนมาตามนัดที่ผู้วิจัยนัดทุกครั้ง.

ผลการศึกษาห้องปฏิบัติการพบว่า ผลการทำงานระดับเอนไซม์ของเซลล์ตับ คือ AST, ALT มีค่าเพิ่มขึ้นในอาสาสมัครจำนวน 7 ราย จาก 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 30 จากจำนวนทั้งหมด. อาสาสมัคร 2 ราย มีค่าการทำงานของระดับเอนไซม์ของเซลล์ตับเพิ่มขึ้น หลังจากรับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวัน. ในสัปดาห์ที่ 3 มีค่าการทำงานของ AST เพิ่มขึ้นจากค่าปกติ 2 เท่า และมีแนวโน้มลดลงในสัปดาห์ที่ 4, กลับมาปกติในสัปดาห์ที่ 5 และมีค่า ALT เพิ่มขึ้นจากค่าปกติและกลับมาปกติ สัปดาห์ที่ 6. อาสาสมัครอีก 5 ราย มีค่า AST เพิ่มขึ้นจากค่าปกติในสัปดาห์ที่ 4 และกลับมาปกติในสัปดาห์ที่ 6 และมีค่า ALT เพิ่มขึ้นจากค่าปกติในสัปดาห์ที่ 4 และกลับมาปกติในสัปดาห์ที่ 7. จากผลการศึกษาดังกล่าว บ่งบอกว่า ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันเป็นพิษต่อเซลล์ตับ, ทำให้เซลล์ตับถูกทำลาย, ระดับเอนไซม์ตับที่อยู่ในเซลล์รั่ว, ส่งออกมาอยู่ในพลาสมา, ทำให้การตรวจระดับเอนไซม์ตับนั้นมีค่าสูงขึ้น. ส่วนอาสาสมัครอีก 13 ราย ไม่พบความเปลี่ยนแปลงการทำงานเอนไซม์ตับ. ผลการตรวจนับระดับการทำงานของ CD4, CD8 และ CD4 : CD8 ratio พบว่า ไม่เปลี่ยนแปลง. แพทย์ผู้ทำการวิจัยทางคลินิกจึงสรุปว่า การบริโภคผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันขนาด 1,300 มิลลิกรัม/วัน ติดต่อกันนาน 28 วัน มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของตับและไม่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน.

จากผลการศึกษาทางคลินิกเฟสแรก ทำให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์จะผ่านการทดสอบความปลอดภัยในสัตว์ทดลองมาระดับหนึ่งแล้ว, อาจจะยังไม่ปลอดภัยต่อการใช้ในมนุษย์ ทั้งๆ ที่ใช้ในขนาดยาที่ได้คำนวณให้อยู่ในระดับต่ำ เพื่อให้มีความปลอดภัยสูงแล้ว, และพบว่า ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรหลายชนิดหากรับประทานเป็นระยะเวลานานมักจะเกิดผลข้างเคียงต่อค่าเอนไซม์ตับและเมื่อหยุดยา จะทำให้อาการดีขึ้น เนื่องจากตับมีหน้าที่ทำลายสารพิษที่เข้าสู่ร่างกาย. การทดสอบระดับเซลล์น่าจะไม่เป็นต้นแบบที่ดีสำหรับการทดสอบในคน เนื่องจากการคำนวณขนาดของยาไม่มีวิธีที่แน่นอน. อีกทั้งการรับยาเข้าร่างกายมนุษย์จะผ่านกระบวนการย่อย, กระบวนการดูดซึมและกำจัด, ซึ่งหากไม่ใช่สารเคมีเดี่ยวๆ แล้ว จะยากต่อการติดตามกลไกการออกฤทธิ์. ทำให้ไม่สามารถประมาณได้ว่า ปริมาณสารทดสอบที่จะสัมผัสกับเซลล์จะมากกว่าหรือน้อยกว่าค่าที่ได้จากการทดลอง. อย่างไรก็ดี การทดสอบในสัตว์ทดลองยังเป็นสิ่งที่ควรต้องทำการศึกษา เนื่องจากหากจะศึกษาให้ละเอียดเรื่องความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ในสัตว์ทดลอง จะพบว่า ในการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังจะพบความผิดปกติเกิดขึ้นเล็กน้อยในด้านเคมีคลินิกและโลหิตวิทยา. นอกจากนี้ ยังพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อบ้างในบางอวัยวะ แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม.

มีความเป็นไปได้ที่ความเป็นพิษจะเกิดขึ้นเนื่องจากการใช้สารสกัดพืช. การสกัดพืชด้วยตัวทำละลายอาจสกัดเอาสารพิษออกมาด้วย. ในขณะที่พืชสดอาจมีองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ที่สามารถลดพิษหรือถ่วงดุลกันได้. แต่ค่า LD_{50} ของทั้งสารสกัดและผลิตภัณฑ์กลับอยู่ในเกณฑ์ปลอดภัยสูงในสัตว์ทดลอง. อีกประเด็นหนึ่งที่อาจนำมาพิจารณาคือ การเกิด interaction ระหว่างตัวยาสำคัญของเปล้าตะวันและพุงทะลาย. ความเป็นพิษที่เกิดขึ้น จึงยังไม่อาจสรุปได้ว่า เกิดจากสารสกัดสมุนไพรเปล้าตะวันหรือไม่. ในส่วนที่ผลิตภัณฑ์ไม่ให้ผลกระตุ้น CD4 และ CD8, อาจเนื่องจากอาสาสมัครเป็นผู้ที่ร่างกายปกติ ไม่ใช่ผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันผิดปกติ. จากการทดสอบในขั้นก่อนคลินิกนั้น เปล้าตะวันจะให้ผลดีในสัตว์ทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน แต่จะไม่แสดงฤทธิ์ในสัตว์ทดลองปกติ.

5. ผลการศึกษาเบื้องต้นทางด้านตลาด และผลกระทบโครงการ

โครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันสำหรับผู้ป่วยเอดส์นี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถปรับสมดุลร่างกายและเพิ่มภูมิคุ้มกันให้แก่ผู้ป่วยเอดส์และผู้ติดเชื้อ HIV, ซึ่งหากสามารถผลิตสู่เชิงพาณิชย์ได้ จะก่อให้เกิดผลกระทบสูงต่อทั้งด้านสังคม, เศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม. หากผู้ป่วยหรือติดเชื้อ HIV มีภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้นจะทำให้เขาเหล่านั้นติดเชื้อแทรกซ้อนได้ยากขึ้น, ลดค่าใช้จ่ายด้านยา และสามารถทำประโยชน์ในสังคมมากขึ้น, ไม่เป็นผู้ที่เป็นภาระหรือถูกรังเกียจในสังคม. นอกจากนั้น จะทำให้เกิดการขยายตัวของการเพาะปลูกเปล้าตะวันใช้พื้นที่การเกษตรมากขึ้น, เกิดการจ้างแรงงานด้านเกษตรและอุตสาหกรรม, พัฒนาด้านเศรษฐกิจ และทำให้อุตสาหกรรมยาจากสมุนไพรเติบโตขึ้น. อย่างไรก็ดี การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาเป็นกระบวนการที่ต้องศึกษาวิจัยอย่างละเอียดถี่ถ้วน เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากที่สุด. การวิจัยชิ้นนี้ เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ผลการวิจัยขึ้นก่อนคลินิกจะอยู่ในเกณฑ์ปลอดภัย, แต่ไม่ได้หมายถึงความปลอดภัยในมนุษย์ และเนื่องจากผลกระทบต่อชีวิตและความปลอดภัยของผู้ป่วยเป็นสิ่งที่สำคัญมาก, จึงปฏิเสธไม่ได้ว่า ผลงานวิจัยชิ้นนี้จะไม่มีความคุ้มค่ากับเงินที่ได้ลงทุนไป. องค์ความรู้ที่เกิดขึ้นจะทำให้ผู้ที่จะใช้สมุนไพรชนิดนี้ได้ตระหนักถึงผลข้างเคียง, ในขณะเดียวกัน จะเป็นแนวทางให้แก่ผู้ที่จะทำการศึกษาวิจัยต่อไป.

6. ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการศึกษาครอบคลุมทั้งด้านเภสัชวิทยา, พิษวิทยา, ควบคุมคุณภาพ และการทดสอบทางคลินิก, ซึ่งมีแนวโน้มที่ดีในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ปรับสมดุลร่างกายหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารให้แก่ผู้ป่วยเอดส์หรือผู้ติดเชื้อ HIV. แต่เป็นที่น่าเสียดายว่า การทดสอบทางคลินิกเฟส 1 ในอาสาสมัครที่มีสุขภาพปกติ พบความผิดปกติของการทำงานของตับในอาสาสมัครถึง 7 ใน 20 ราย, ทำให้ไม่สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันสู่เชิงพาณิชย์ได้. ผู้วิจัยได้สรุปข้อสังเกตที่อาจเป็นสาเหตุถึงความไม่ปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันไว้ ดังนี้:

1. การใช้ตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรเปล้าตะวันอาจสกัดเอาองค์ประกอบที่มีพิษของสมุนไพรออกมาและแสดงฤทธิ์ที่ชัดเจนมากกว่าที่จะรับประทานในรูปสมุนไพรแห้ง.
2. ความเป็นพิษแสดงฤทธิ์ในมนุษย์ชัดเจนกว่าในหนูทดลอง.
3. เกิด interaction ระหว่างสมุนไพรพุงทะลายและสมุนไพรเปล้าตะวัน.

ดังนั้น หากจะมีการศึกษาสมุนไพรเปล้าตะวันต่อ, น่าจะพิจารณาสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดว่ามีตัวใดเป็นพิษหรือไม่, สามารถกำจัดออกไปได้หรือไม่ และเมื่อกำจัดแล้วสารสกัดที่เหลือยังคงให้ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือไม่. ในขณะเดียวกัน การศึกษาผลผู้ป่วยที่รับประทานผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในรูปผงสมุนไพรแห้งว่ามีระดับเอนไซม์ตับสูงขึ้นหรือไม่ เป็นเรื่องที่น่าติดตาม. ทั้งนี้ การจะศึกษาทางคลินิกของผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันเพิ่มขึ้น ควรจะต้องละเว้น เนื่องจากไม่เหมาะสมในด้านจริยธรรมการทดสอบในมนุษย์.

นอกจากนี้ หากสนใจศึกษาเรื่อง interaction ของสมุนไพร ควรจะมีการศึกษาลงในรายละเอียดด้านสัดส่วนของสมุนไพรทั้งสองชนิดต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาที่เกิดขึ้น. เนื่องจากจะเห็นว่า การทดลองผสมสมุนไพรทั้งสอง ไม่ได้มีฤทธิ์เสริมกัน แต่ค่อนข้างมีฤทธิ์ต่ำกว่าที่จะใช้สมุนไพรเดี่ยวหรือเพียงตัวใดตัวหนึ่ง.

7. เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. 2538. Thai Herbal Pharmacopoeia, เล่มที่ 1. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข.

กระทรวงสาธารณสุข. 2543. Thai Herbal Pharmacopoeia. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข.

กระทรวงสาธารณสุข. 2538. Thai Herbal Pharmacopoeia. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข.

เมฆมณี, รัชนี. 2538. ความก้าวหน้าทางเภสัชวิทยาของยาปรับภูมิคุ้มกันยาต้านมะเร็งและยาลดความดันโลหิต. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศิริแสงเลิศ, สิริภรณ์. 2555. ระบบภูมิคุ้มกันและสารปรับภูมิคุ้มกัน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.GPO.or.th/rdi/html/immunesystem.html, [เข้าถึงเมื่อ 25 สิงหาคม 2555].

ศูนย์ข้อมูลระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. 2555. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.boe.moph.go.th/files/report, [เข้าถึงเมื่อ 7 มิถุนายน 2555].

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. ม.ป.ป. คู่มือสมุนไพรพุงทะลาย. 9 หน้า.

สถาบันเอดส์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2548. เข้าถึงได้จาก http://www.aidskku.kku.ac.th, [เข้าถึงเมื่อ 25 สิงหาคม 2555ล.

สุโนภักดิ์, เรียมศิริ และอยู่สบาย, เอนก. 2555. การศึกษาความปลอดภัยและผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของการใช้ผลิตภัณฑ์เปล้าตะวันในคนปกติ. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 26 หน้า.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย. 2538. การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้ในผู้ติดเชื้อ เอช ไอ วี. 53 น.

Adler, I. D., 1984. Cytogenic Tests in Mammals. Oxford: IRL Press, pp. 275–306.

Akiyama H. *et al.,* 2004. Chondroitin sulphate structure affects its immunological activities on murine splenocytes sensitized with ovalbumin, *Biochem. J.,* **382**, pp. 269–278.

Ardayfio, P. and Kim, K. S., 2006. Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light-dark emergence task in mice. *Behavioral Neuroscience,* **120**, pp. 249-259.

Auletta, C. S., 1995. Acute, Subchronic and Chronic Toxicity, *In* : J. M. Derelanko, and A. M. Holinger, eds. CRC Handbook of Toxicology. Florida: CRC Press, pp. 51-104.

Barry, S. L., 1995. Animal Clinical Pathology. *In* : J. M. Derelanko, and A. M. Hollinger, eds. CRC Handbook of Toxicology. Florida: CRC Press, pp. 517-537.

Brown, G. R. and Nemes, C., 2008. The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: is head-dipping a valid measure of neophilia. *Behav Processes*., **78**, pp. 442-448.

Donald, J. E., 1997. The Basic of Toxicity Testing. 2nd ed. New York: CRC Press.

Ito, Y. and Ito, M., 2001. Suppressive effect of (-)-Epigallocatechin gallate on aflatoxin B_1-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. *Journal of Health Science,* **47**(3), pp. 248 – 257.

Jacysyn, J. F., Abrahamsohn, A. and Macedo, M. S., 2001. Modulation of delayed-type hypersensitivity during the time course of immune response to a protein antigen. *Immunology*, **102**, pp. 373-379.

Janway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchick, M. J., 2005. Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science Publishing.

Kido, H. *et al.,* 1998. Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic effects of d-2[4-(3-Methyl-2-thienyl) phenyl] propionic acid (M-5011), a new non –steroidal anti-inflammatory drug, in rats and guinea pigs. *Jpn. J. Pharmacol*., **76,** pp. 75-86.

Krishna, H. N. G. *et al.,* 2006. Antianxiety activity of NR-ANX-C, a polyherbal preparation in rats. *Indian J. Pharmacol*., **38**, pp. 330-335.

Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., 1949. *J. Pharmacol. Exp.Ther.,* **96**, pp. 99-113.

Naowarat, S. *et al.,* 2007. Immunomodulatory activities of *Scaphium scaphigerum* in mice, Proceedings of VPAT Regional Veterinary Congress, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 1997. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test – Chromosomal Analysis, Test Guideline No. 475.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 1998. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. Test Guideline No. 408.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Test Guideline No. 423.

Pantipa, S. *et al.,* 2006. Malva nut gum. (Part I) Extraction and physicochemical characterization. *Carbohydrate Polymers,* **64**, pp. 247-253.

Piyarat, S., 2 0 0 5 . Immunostimulating activity of some the extract from *Scaphium scaphigerum* fruits, Master's Thesis, Bangkok: Chulalongkorn University.

Preston *et al*., 1987. Mammalian *in vivo* cytogenic assays analysis of chromosome aberration in bone marrow cells. *Mutation Research,* **189**, pp. 157–165.

Puri, A. *et al.,* 1993. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata. J. of Natural Products*, **56**(7), pp. 995-999.

Puri, A. *et al.,* 2000. Immunostimulant activity of dry fruits and plant materials used in Indian traditional medical system for mothers after child birth and invalids. *J. of Ethnopharmacology,* **71**, pp. 89-92.

Ryng, S. *et al.,* 2005. Immunosuppressive activity of an isoxazolo[5,4-e]triazepine – compound RM33.I. Effects on the humoral and cellular immune response in mice. *Pharmacological Reports,* **57**, pp. 195-202.

Sun, J., Song, X., and Hu, S., 2008. Ginsenoside Rg1 and aluminum hydroxide synergistically promote immune responses to ovalbumin in BALB/c mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, pp. 303–307.

Thangam, C. and Dhananjayan, R., 2003 Antiinflammatorypotential of the seeds of *Carum copticum* Linn., *Indian Journal of Pharmacology*, **35**, pp. 388-391.

United State Environmental Protection Agency (EPA). 1998. Health effects test guidelines OPPTS 870.5385 Mammalian bone marrow chromosome aberration test.

United State Environmental Protection Agency (EPA). 1998. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-1100 Acute Oral Toxicity, EPA. 712-6-96-190.

Viganò, A. *et al.,* 2008. Humoral and cellular response to influenza vaccine in HIV-infected children with full viroimmunologic response to antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr*., **48**(3), pp. 289-96.

Vogel, H. G., 2002. Drug Discovery and Evaluation, 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag.

Winter, C. A. *et al.,* 1962. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol*., **111**, pp. 544-547.

World Health Organization (WHO). 1985. Environmental health croteria 51. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals.

Wolff, M. *et al.,* 1995. Clinical characteristics and natural history of human immunodeficiency virus infection: Study in a Chilean population served at a multiprofessional pilot center. *Rev. Med. Chil*., **123**(1), pp. 61-73.

Wu, B., 1992. Recent development of studies on traditional Chinese medicine in prophylaxis and treatment of AIDS. *J. Tradit. Chin. Med*., **12**(1), pp. 10-20.