บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

การเตรียมเชื้อบิด

ในการเตรียมโอโอซีสต์ของเชื้อบิดชนิด *E. tenella* ในห้องปฏิบัติการ เตรียมได้จากโอโอซีสต์ระยะติดต่อ (ภายในประกอบด้วย 4 สปอโรซีสต์) โดยการขูดผนังไส้ตันของไก่ป่วย จากผลการศึกษา พบว่า มีการปะปนของ cecal content และผนังลำไส้ในสารละลายเชื้อบิด (เก็บไว้ใน potassium dichromate) การที่พบโอโอซีสต์เป็นจำนวนมากในเซลล์ผนังลำไส้ เป็นเพราะวงจรชีวิตของตัวเชื้อบิดมีการเจริญแบ่งตัวภายในเซลล์ผนังไส้ตันชั้น epithelium แล้วเข้าไปฝังตัวอยู่ใน intrapithelial lymphocytes เพื่อเจริญเติบโต (Trout and Lillehoj, 1995) จนเป็น zygote แล้วมีการสร้างผนังหนาหุ้มล้อมรอบจนเป็นโอโอซีสต์ฝังตัวอยู่ภายใน parasitophorous vacuole (Mouafo *et al*., 2000) ส่วนสาเหตุที่ใช้โอโอซีสต์จากผนังไส้ตัน และ cecal content นั้น เนื่องจากสะดวกต่อการเก็บเชื้อ เพราะมีการปะปนของเศษอาหารหรือสิ่งปะปนอื่นๆ น้อยกว่าการเก็บจากอุจจาระของไก่

หลังจากได้โอโอซีสต์ที่ผ่านการทำ floatation technique ด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Jackson (1964) เพื่อลดสิ่งปะปนดังกล่าวแล้ว ได้ใช้ glass beads บดผนังโอโอซีสต์เพื่อให้ได้สปอโรซีสต์ที่อยู่ภายในออกมา อันเป็นวิธีเดียวกับการทดลองของ Zhang *et al.* (1997) ส่วนสาเหตุที่ใช้ glass beads อาจพิจารณาจากลักษณะวงจรชีวิตของเชื้อบิดภายในตัวไก่เป็นหลัก ซึ่งหลังจากที่สัตว์กินโอโอซีสต์ระยะติดต่อเข้าไปแล้ว โอโอซีสต์จะถูกบดภายในกึ๋น (gizzard) เพื่อให้ได้สปอโรซีสต์ออกมา โดยผนังของโอโอซีสต์ดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ผนังชั้นนอก (wall-forming body I) เป็นผนังเรียบ สำคัญต่อการมีชีวิตของโอโอซีสต์เนื่องจากใช้ป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อม และผนังชั้นใน (originating form WF II) มีลักษณะเป็นรอยต่อสร้างจาก micropyle ยาวตั้งแต่ด้านบนถึงด้านล่างของโอซีสต์ จึงง่ายต่อการทำลายด้วยกระบวนการทางกลวิธีที่พบในกึ๋นมากกว่าการย่อยโดยวิธีทางเคมีในลำไส้ของไก่ (Mouafo *et al*., 2000) ส่วนสปอโรซีสต์ที่ได้จะถูกย่อยโดยการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และน้ำดี ภายในลำไส้เล็ก ผลที่ได้ทำให้สปอโรซอยท์ออกจากสปอโรซีสต์เข้าไปเจริญในผนังลำไส้เพื่อก่อโรค

ด้วยเหตุผลดังกล่าว การกระตุ้นให้สปอโรซอยท์ออกจากสปอโรซีสต์ในห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้โดยใช้สารละลาย excystation ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ trypsin กับน้ำดีไก่ ภายใต้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิที่เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ระหว่าง 41 และ 47 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอนไซม์ Trypsin-EDTA (0.25%) และน้ำดีไก่ ซึ่งแบ่งออกเป็นที่ระดับ 2.5, 5, 15 และ 30% นาน 2 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส มีร้อยละการ excystation เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มของน้ำดี มากกว่าที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษาดังกล่าว จึงได้เลือกใช้สารละลาย excystation ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ trypsin กับน้ำดีไก่ระดับ 5% อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส ทุกครั้งที่เตรียมสปอโรซอยท์ เช่นเดียวกับรายงานของ Wagenbach (1969) และ Jeffers and Wagenbach (1970) ที่ใช้สารละลาย excystation ประกอบด้วย Trypsin-EDTA (0.25%) น้ำดีไก่ 5% ภายใต้อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส แต่แตกต่างกันที่อุณหภูมิซึ่งต่ำกว่า

นอกจากการใช้น้ำดีไก่เพื่อกระตุ้นสปอโรซอยท์ออกจากสปอโรซีสต์ในห้องปฏิบัติการ อาจจะใช้สารเคมี คือ taurodeoxycholate ในสารละลาย excystation ดังรายงานของ Patton and Bogman (1979) ที่ศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารเคมีจำพวก bile salt ที่มีขายทางการค้า พบว่า การใช้ sodium taurodeoxycholate 4% (w/v) ใน Trypsin-EDTA 0.25% อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส มีผลกระตุ้นสปอโรซอยท์ออกจากสปอโรซีสต์ได้เกือบ 100% ส่วนในการทดลองไม่ได้ใช้ taurodeoxycholate แต่ใช้น้ำดีแทนเนื่องจากต้องการให้สภาวะการทดลองคล้ายธรรมชาติในตัวไก่ให้มากที่สุด

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

จากการสกัดผงแห้งสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด คือ กระชาย (ส่วนเหง้า) ไพล (ส่วนเหง้า) และใบฝรั่ง (ส่วนใบรวมก้าน) ชนิดละ 100 ก. ด้วยน้ำ นำไปประเหยให้แห้งโดยวิธี distillation in vacuum ได้ส่วนสกัดหยาบ (crude extract) เท่ากับ 9.27, 4.37 และ 4.42 ก. ตามลำดับ แล้วจึงนำส่วนสกัดหยาบที่ได้ละลายด้วยน้ำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตัวอ่อนไก่ และเชื้อบิดต่อไป

นอกจากวิธีการสกัดสมุนไพรข้างต้น Jaiarj *et al.* (1999) ได้ใช้วิธีการสกัดผงใบฝรั่ง (1 กก.) ด้วยน้ำ โดยการทำให้สารแข็งตัวอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิต่ำ แล้วดึงน้ำออก (dehydrate) ในสุญญากาศ หรือเรียกว่ากระบวนการ lyophilized จะได้ส่วนสกัดหยาบ 0.93% จากรายงานดังกล่าว แสดงว่า วิธีการสกัดสมุนไพรมีผลต่อปริมาณส่วนสกัดหยาบที่ได้ โดยในการทดลองถ้าคิดเทียบเป็นร้อยละของผงแห้งใบฝรั่งจะได้ส่วนสกัดหยาบเท่ากับ 4.42% ซึ่งได้ปริมาณมากกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะส่วนสกัดที่ผ่านการระเหยแห้งนั้นยังมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก นอกจากการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายแล้ว ยังมีรายงานของ วิศิษย์ และคณะ (2543) ที่ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายผงใบฝรั่ง แล้วนำไปประเหยให้แห้งโดยวิธี distillation in vacuum ได้ส่วนสกัดหยาบ 107 ก. หรือคิดเป็นผงแห้ง 42.8% เช่นเดียวกับวันชัยและคณะ (2543) ได้สกัดผงใบฝรั่ง (200 ก.) ด้วย ethylalcohol (50%) นำไปประเหยแห้ง และนำไป lyophilized ต่อจะได้ส่วนสกัด 26.5 ก. หรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

13.25% ส่วนการเลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการทดลองนี้ เพราะคำนึงถึงความสามารถในการละลายได้ของส่วนสกัดหยาบในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากกระชาย และไพล เมื่อใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย ส่วนสกัดหยาบที่ได้จะไม่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ แต่จะจับตัวเป็นชั้นน้ำมันเหนียวลอยอยู่เหนือเซลล์ ทำให้ไม่สามารถมองเห็นเซลล์เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เกิดผลเสียต่อการนับจำนวนเซลล์ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะส่วนเหง้าของกระชาย และไพล ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยในระดับที่สูงคือ 0.8% (วันดี, 2541) และ 2% (สมภพ, 2543) ตามลำดับ

การทดสอบเซลล์ที่ได้จากการทำ primary cell culture

เซลล์สัตว์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เตรียมได้โดยตรงจากเนื้อเยื่อลำตัวของตัวอ่อนไก่ (chick embryo) จากการทำ primary explantation technique หรือ primary cell culture ในขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) เหตุผลที่ใช้เนื้อเยื่อจากตัวอ่อนไก่ เนื่องจากมีความปลอดเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น เจริญง่าย กระจายตัวเร็ว สามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็วหลังจากเริ่มต้นเลี้ยง ลักษณะการเจริญของเซลล์เป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) ยึดเกาะกับพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ (adherent cells) เจริญได้อย่างต่อเนื่อง (continuous cell) เมื่อนำเซลล์มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายไฟโบรบลาสต์ รูปร่างยาวเรียวคล้ายกระสวย บางเซลล์มีไซโตพลาสซึมยาวออกไปหลายด้าน มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ สอดคล้องกับรายงานของ วราภรณ์ (2546) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ตัวอ่อนไก่ที่ได้จากการทำ primary cell culture ย้อมด้วยสี heamatoxylin พบเซลล์ 2 แบบ คือ เซลล์ที่มีลักษณะคล้ายไฟโบรบลาสต์และไมโอบลาสต์ (myoblast) แต่สังเกตพบจำนวนเซลล์ที่คล้ายไฟโบรบลาสต์มากกว่า ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบทั้งในกลุ่มควบคุมปกติ (เติมอาหารเลี้ยงเซลล์) กลุ่มควบคุมที่มีตัวทำละลาย (เติมน้ำกลั่น 60 ไมโครลิตร/มล.) และกลุ่มที่ใช้ทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรหรือแอมโพรเลี่ยม

เนื่องจากเซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อต้นตอสด เซลล์จึงมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนออกมาจากชิ้นเนื้อได้อย่างรวดเร็ว และเจริญเต็มพื้นที่ขวดเลี้ยงเซลล์ภายใน 1 สัปดาห์ เซลล์ที่อยู่ในพื้นที่ที่หนาแน่นเกินไปนี้จะไม่สามารถแบ่งตัวได้เพราะเกิด contact inhibition หรือ confluent มีผลให้เซลล์ (ดันตัวขึ้นซ้อนกันเป็น multilayer) ค่อยๆ ตายไป เซลล์ที่เหลืออยู่เจริญช้าลง ดังนั้นจึงแยกเซลล์จากขวดเดิมไปเลี้ยงในขวดใหม่ (subculture) เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญต่อไป

หลักเกณฑ์โดยทั่วไปที่ใช้พิจารณาความสามารถในการเจริญของเซลล์ คือ การจำแนกเซลล์ตายออกจากเซลล์ปกติ (เซลล์ที่มีชีวิต) ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้การทดสอบด้วยการย้อมสี trypan blue ซึ่งเป็นสีที่ไม่ทำให้เซลล์ตาย เพียงแต่แทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์ปกติจะมีความสามารถในการขจัดหรือขับสีออกนอกเซลล์ได้ ทำให้ไม่ติดสีหรือติดน้อยมาก ในขณะที่เซลล์ที่ไร้ความสามารถจะบวมพอง มีขนาดใหญ่ขึ้น และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ติดสีน้ำเงินเข้ม เนื่องจากไม่สามารถขับสีและน้ำที่ซึมเข้าเซลล์ได้ ดังนั้นการย้อมด้วยสี trypan blue จึงสามารถใช้วัดความมีชีวิตของเซลล์ (% viability) ได้ โดยนับแยกเฉพาะเซลล์ที่ติดสี คิดเทียบเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์ทั้งหมด (วีระ, 2547) จากการทดลองนี้ พบว่า ลักษณะการติดสีของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทุกชนิดหรือแอมโพรเลี่ยมทุกระดับความเข้มข้น เมื่อย้อมด้วย trypan blue นาน 3 ชั่วโมง เซลล์มีการติดสีในรูปแบบเดียวกัน คือ พบนิวเคลียสติดสีน้ำเงินอยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมทำให้สามารถนับแยกจำนวนเซลล์ได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue (เซลล์ที่มีชีวิตรอด) ก็สามารถนับจำนวนได้เช่นกัน

ทั้งนี้การศึกษาเรื่องเซลล์มีข้อควรคำนึงในเรื่องของความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่เลี้ยงในสภาพ *in vitro* ซึ่งมีความแตกต่างจากเซลล์ในร่างกาย (*in vivo*) ในแง่ของการเจริญและการแบ่งตัว ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ และเซลล์ต่อสิ่งแวดล้อม เพราะสภาพแวดล้อม เช่น อาหาร ฮอร์โมน ตลอดจนโครงสร้าง 3 มิติ ซึ่งเคยมีอยู่ในร่างกายนั้นเปลี่ยนแปลงไป แต่ที่สังเกตได้ง่ายในการทดลองนี้คือ อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ซึ่งใช้ที่ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณ CO_2 5% ซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด แต่สำหรับสัตว์ปีกซึ่งปกติมีอุณหภูมิร่างกายประมาณ 40 องศาเซลเซียส จะไม่ค่อยเหมาะสมนัก แต่ทั้งนี้ Rain and Rubin (1968) กล่าวว่า เซลล์ตัวอ่อนไก่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35-42 องศาเซลเซียส และเริ่มตายเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 43 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองจึงมีผลต่อเซลล์ไม่มากเท่าใดนัก

เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์ตัวอ่อนไก่ระหว่างสารสกัดสมุนไพร (กระชาย ไพล และใบฝรั่ง) และยาต้านบิดชนิดแอมโพรเลี่ยม (รายละเอียดในตารางภาคผนวก ข. ที่ 1-4) พบว่า การใช้ยาต้านบิดที่ความเข้มข้นเพียง 0.06 ก./มล. มีผลให้เซลล์รอดชีวิตน้อยกว่าร้อยละ 50 ส่วนสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ต้องใช้ในปริมาณที่มากกว่าถึงจะมีผลต่อเซลล์ โดยเมื่อใช้สารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้นเท่ากับหรือมากกว่า 0.09 ก./มล. สารสกัดจากกระชายและไพลในระดับที่สูงกว่า คือ 0.12 และ 0.15 ก./มล. ถึงจะมีผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 50 จากข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อบ่งชี้ได้ว่า การใช้ยาต้านบิดมีความปลอดภัยต่อเซลล์น้อยกว่าสมุนไพร เนื่องจากการใช้ในปริมาณน้อยมีผลให้เซลล์ตายมากกว่า 50%

นอกจากการตอบสนองของเซลล์ตัวอ่อนไก่ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์แล้ว ยังสังเกตพบว่า การใช้สารสกัดจากกระชายที่ความเข้มข้น 0.06-0.12 ไมโครกรัม/มล. มีผลให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ กล่าวคือ เห็นขอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชัดเจนขึ้น แสดงถึงการหดตัวของเซลล์ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น ติดสีน้ำเงินของ trypan blue ชัดเจนมากขึ้น หากเป็นเซลล์ปกติจะมีรูปร่างแบน แผ่กระจาย ไม่ติดสีหรือติดสีน้อยมาก ในขณะที่การทดสอบด้วยสารสกัดจากไพล ใบฝรั่ง หรือแอมโพรเลี่ยม ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ดังกล่าว ทั้งนี้อาจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นผลเนื่องจากฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายที่ใช้ทดสอบ ซึ่งในการทดลองนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรเท่านั้น ไม่สามารถบ่งชี้ถึงชนิดของสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อเซลล์ และข้อมูลที่ได้นี้เป็นเพียงข้อสังเกตโดยทั่วไปเท่านั้น ไม่มีการวัดขนาดของเซลล์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

การทดสอบสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อบิด

จากการทดสอบสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด และแอมโพรเลี่ยม ต่อเชื้อบิดระยะสปอโรซอยท์ ย้อมด้วยสี Hoechst dye (HO) และ Propidium iodide (PI) นำมาตรวจนับภายใต้กล้อง fluorescene microscope ผลปรากฏว่า ไม่สามารถนับแยกจำนวนสปอโรซอยท์ที่มีชีวิตและ/หรือตาย เนื่องจากนิวเคลียสมีขนาดเล็กมากและติดสีน้อยจนไม่สามารถมองเห็นสี fluorescene ทั้ง 2 ชนิด สะท้อนผ่านกล้องที่มีในห้องปฏิบัติการนี้ได้ แต่ในบางกรณีสังเกตพบการเรืองแสงของสี HO ที่ผนังโอโอซีสต์ ลักษณะเป็นเลขศูนย์สีน้ำเงิน และไม่ติดสีภายใน นอกจากการสังเกตผลจากกล้องจุลทรรศน์ซึ่งอาจเป็นวิธีการที่ขึ้นอยู่กับการแปรผลของผู้ทดลองแล้ว ยังมีวิธีอื่นอีก เช่นในรายงานของ Hofmann *et al.* (1993) ได้หาร้อยละความมีชีวิตและตายของสปอโรซอยท์ที่ทดสอบยาต้านบิดด้วยเครื่อง flow cytometer ใช้สี fluorescein diacetate (FDA) และ PI แต่ทั้งนี้สปอโรซอยท์ที่นำมาทดสอบต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ค่าความเป็นพิษ (toxicity value)

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร และยาต้านบิดชนิดแอมโพรเลี่ยมต่อเซลล์ ทำได้โดยการนำอัตราการรอดชีวิตและการตายของเซลล์หลังจากได้รับสารทดสอบมาคำนวณหาความเข้มข้นที่มีผลต่อเซลล์ตัวอ่อนไก่ร้อยละ 50 หรือ Effective concentration 50 (EC_{50}) ซึ่งเป็นการวัดพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) นอกจากค่าความเป็นพิษดังกล่าวแล้ว ยังแสดงในรูป Lethal dose 50 (LD_{50}) หรือ Lethal concentration 50 (LC_{50})

จากการทดสอบสารสกัดกระชาย ไพล หรือใบฝรั่ง และยาต้านบิด พบว่า มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.219, 0.436, 0.091 และ 0.093 ก./มล. ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแอมโพรเลี่ยมและใบฝรั่งมีผลต่อเซลล์ (จำนวนร้อยละ 50) มากกว่า หรือปลอดภัยน้อยกว่ากระชาย และไพล ส่วนไพลมีความปลอดภัยมากที่สุด สอดคล้องกับรายงานของรังสรรค์และคณะ (2529) ที่กล่าวว่า ไพลเป็นสมุนไพรที่มีความปลอดภัยสูง เนื่องจากมีค่า LD_{50} ค่อนข้างสูง คือ 20 และ 80 ก./กก. น้ำหนักตัวของหนู เมื่อสกัดด้วยแอลกอฮอล์และเฮกเซน ส่วนวัลภา (2525) ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำสกัดไพลต่อกล้ามเนื้อเรียบในลำไส้ของหนูขาว พบว่า ขนาดของน้ำสกัดไพล 0.48 ก. มีผลให้กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้คลายตัวได้ 100% (ED_{100})

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในส่วนของใบฝรั่ง วันชัยและคณะ (2543) กล่าวว่า การใช้ใบฝรั่งมีความปลอดภัยมากกว่าเปลือกผลทับทิม เนื่องจากมีค่า LC_{50} สูงกว่า เมื่อใช้สารสกัดหยาบทดสอบการหดตัวของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูตะเภา ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งที่มีผลยับยั้งการหดตัวของลำไส้ได้ร้อยละ 50 ของการหดตัวสูงสุด มีค่าเท่ากับ 0.23 ก. ส่วนในรายงานของ Jaiarj *et al.* (1999) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งด้วยน้ำในหนูตะเภา พบว่า ความเข้มข้นที่มีผลให้หนูตายมากกว่าครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 5 ก./กก. น้ำหนักตัว ในขณะที่ เอมมนัสและคณะ (2538) พบว่า ขนาดของสารสกัดใบฝรั่งที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มากกว่า 20 ก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งให้ค่า LD_{50} ใกล้เคียงกับไพลในรายงานของ รังสรรค์และคณะ (2529) ดังกล่าวข้างต้น แสดงถึงระดับความปลอดภัยที่ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับผลการทดลองที่ว่า ไพลมีความปลอดภัยมากกว่าใบฝรั่ง

องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบของกระชาย (ส่วนเหง้า) ไพล (ส่วนเหง้า) และใบฝรั่ง (ส่วนใบปนก้าน) พบว่า สมุนไพรทุกชนิดมีระดับโปรตีนและไขมันค่อนข้างต่ำโดยเฉพาะไพลมีปริมาณโภชนะดังกล่าวต่ำที่สุด (6 และ 4% DM) ในขณะที่สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีระดับเยื่อใยค่อนข้างสูงโดยเฉพาะใบฝรั่งที่มากถึง 30.86% DM ซึ่งมีค่าสูงกว่ารายงานของเชนทร์ (2547) ที่พบว่า ใบฝรั่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีปริมาณเยื่อใยเท่ากับ 13.85% DM ซึ่ง % DM ของใบฝรั่งจะมีค่าสูงขึ้นตามอายุและความแก่ของใบ (Kumar and Pandey, 1981) ด้วยเหตุนี้การนำพืชสมุนไพรดังกล่าวมาใช้ในสูตรอาหารสัตว์ควรพิจารณาถึงระดับที่ใช้ เนื่องจากเยื่อใยในอาหารจะมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับคุณค่าทางโภชนะของอาหาร (สมบัติ, 2545) และการย่อยได้เป็นเหตุให้สัตว์ได้รับโภชนะที่นำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยลง นอกจากนี้อาหารที่มีเยื่อใยสูงยังมีความฟ่าม ซึ่งมีผลต่อการกินได้ของไก่และอาจส่งผลเสียต่อสมรรถภาพการผลิตของสัตว์ด้วย

การศึกษาในฟาร์มทดลอง

ผลของสมุนไพรต่อการเกิดโรคบิดไส้ตัน (การทดลองที่ 1)

การศึกษาในขั้นตอนนี้ได้พิจารณาระดับการใช้สมุนไพรในอาหารไก่เนื้อ จากค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อเซลล์ร้อยละ 1, 25 และ 50 ในห้องปฏิบัติการ นำมาคำนวณเป็นปริมาณสมุนไพรที่ไก่ได้รับต่อวัน ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 16 ปริมาณสมุนไพรที่ใช้ในสูตรอาหาร (ก./กก. อาหาร) คำนวณจากค่า EC ของสารสกัดหยาบที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ร้อยละ 1, 25 และ 50 ตามลำดับ

ชนิดสมุนไพร	EC_1	EC_{25}	EC_{50}
กระชาย	-	20.2	47.2
ไพล	13.52	91.2	199*
ใบฝรั่ง	-	14.0	41.2

* ไม่ได้ใช้ในการทดลอง

EC_1, EC_{25}, EC_{50} = ปริมาณของสารทดสอบที่มีผลต่อสัตว์ร้อยละ 1, 25 และ 50 ตามลำดับ

จากตารางจะเห็นว่าสมุนไพรชนิดไพลนั้นใช้ที่ระดับต่ำ (EC_1) แทนระดับสูง (EC_{50}) ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณที่ใช้จะสูงถึง 20% ทำให้อาหารมีความฟ่ามรวมทั้งไพลมีกลิ่นฉุนอาจมีผลต่อการกินได้ของไก่ ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณอาหารที่กินได้ก็พบว่ามีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นจริง

ค่าคะแนนรอยโรค (Lesion scores)

จากการป้อนเชื้อบิด *E. tenella* ให้กับไก่ทุกตัว เมื่ออายุได้ 21 วัน จำนวนตัวละ 10^6 sporulated oocysts พร้อมกับให้อาหารทดลองแบบผงผสมเองเสริมด้วยสมุนไพรแต่ละชนิด (ไพล กระชาย และใบฝรั่ง) ในระดับที่แตกต่างกัน คือ 6 กลุ่มแรก ให้ได้รับอาหารที่เสริมด้วยกระชาย หรือไพล หรือใบฝรั่งตามระดับที่คำนวณได้จากค่า effective concentration (ดังแสดงในตารางที่ 16) ส่วนที่เหลืออีก 2 กลุ่ม เป็นกลุ่มที่ไม่เสริม (ควบคุมลบ) และเสริมยาต้านบิดชนิดแอมโพรเลี่ยม (ควบคุมบวก) ผลปรากฏว่า หลังจากไก่ได้รับเชื้อไปแล้ว 6 วัน กลุ่มที่ให้สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดให้ค่าคะแนนรอยโรค (คะแนน 1-2) สูงกว่ากลุ่มที่ให้ยาต้านบิด (คะแนน 0.4) แต่ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้ยาต้านบิดหรือสมุนไพรในอาหารซึ่งให้ค่าคะแนนรอยโรคสูงที่สุด (คะแนน 2.4) แสดงว่าสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดในระดับที่นำมาศึกษาสามารถป้องกันและ/หรือยับยั้งการเกิดโรคได้ในระดับหนึ่ง แต่ยังมีประสิทธิภาพดีน้อยกว่าการใช้ยาต้านบิด ซึ่งผลของเชื้อบิด *E. tenella* ที่มีต่อสภาพในไส้ตันของไก่สอดคล้องกับรายงานของ Augustine (1999) ที่ให้เชื้อบิด *E. tenella* ($5x10^4$ โอโอซีสต์) ในไก่เนื้ออายุ 14 วัน พบว่า ในวันที่ 6 หลังจากป้อนเชื้อ ไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดให้ค่าคะแนนรอยโรคเท่ากับ 3.1 สำหรับผลของยาต้านบิดก็สอดคล้องกับ Conway *et al*. (1990) ที่พบว่าการป้อนเชื้อ *E. tenella* ($2x10^5$ โอโอซีสต์) ในไก่เนื้ออายุ 14 วัน ร่วมกับการใช้ยาต้านบิดชนิด salinomycin (60 มก./กก) ทำให้ไก่มีค่าคะแนนรอยโรคสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาต้านบิด

ส่วนวันที่ 12 หลังการป้อนเชื้อ พบว่า ไก่ทุกกลุ่มให้ค่าคะแนนรอยโรคลดลง และไม่ปรากฏวิการในกลุ่มที่ใช้ยาต้านบิด กระชาย (EC_{50}) และไพล (EC_1) ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ใช้ยาต้านบิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หรือสมุนไพรในอาหารให้ค่าคะแนนรอยโรคสูงกว่าทุกกลุ่ม (คะแนน 1.13) จากผลดังกล่าวแสดงว่าสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์สมานลำไส้จากการเข้าทำลายเซลล์เชื้อบิดได้ดีแต่ยังคงด้อยกว่าการใช้ยาต้านบิด สอดคล้องกับรายงานของ Turk (1972) ที่กล่าวว่า ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคหลังจากได้รับเชื้อแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะรุนแรง (acute phases) จะพบรอยโรค หรืออาการทางพยาธิสภาพค่อนข้างสูงหลังจากป้อนเชื้อไปแล้ว 6 วัน ต่อมาเป็นระยะที่เซลล์ลำไส้มีการสร้างเซลล์ขึ้นมาทดแทนเซลล์เดิมที่ถูกทำลายไป (recovery phases; 12 DPI) ในระยะนี้อาการหรือวิการต่างๆ จะลดลง ส่วนระยะสุดท้ายเป็นระยะที่เซลล์ลำไส้มีการฟื้นฟูจนสมบูรณ์แล้ว ซึ่งกว่าจะถึงระยะนี้ต้องใช้เวลานานถึง 28 วัน หลังการได้รับเชื้อถ้าไก่ไม่ได้รับเชื้อเข้าไปอีก แต่ทั้งนี้ระดับความรุนแรงของโรคนอกจากระยะเวลาหลังการได้รับเชื้อแล้วยังขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ไก่ได้รับเข้าไปด้วย (Idris *et al*., 1997) จากที่กล่าวมา การศึกษาผลของยาต้านบิดหรือสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพภายในลำไส้ด้วยการพิจารณาค่าคะแนนรอยโรค จึงได้ศึกษาในวันที่ 6 และ 12 หลังการป้อนเชื้อเพื่อเปรียบเทียบผลการลดรอยโรคในวันที่ 6 และการสมานลำไส้ในวันที่ 12 ของการให้เชื้อ

เมื่อพิจารณาความยาว และน้ำหนักไส้ตัน หลังจากได้รับเชื้อไปแล้ว 6 วัน พบว่า กลุ่มที่ได้รับไพลระดับต่ำ มีไส้ตันยาวใกล้เคียงกับกลุ่มที่ใช้ยาต้านบิด (11.6 vs. 12.3 ซม.) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรชนิดอื่นมีไส้ตันสั้นลงเช่นเดียวกับกลุ่มที่ไม่ได้ใช้สมุนไพรหรือยาต้านบิด ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับไพลระดับสูงมีผลให้ลำไส้ตันเบากว่าทุกกลุ่ม

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า ค่าคะแนนรอยโรคมีความสัมพันธ์ผกผันกับความยาวไส้ตัน เช่นเดียวกับ Witlock (1982) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะไส้ตันหลังการป้อนเชื้อ *E. tenella* ($1.5x\ 10^5$ โอโอซีสต์) ในไก่เนื้ออายุ 14 วัน พบว่า ไส้ตันของไก่ที่ได้รับเชื้อ (6 DPI) สั้นกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ และลำไส้มีน้ำหนักมากขึ้นหลังจากได้รับเชื้อ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์ผนังลำไส้ถูกทำลายจากการติดเชื้อ ทำให้ปริมาณเซลล์น้อยลงกว่าปกติ จึงอาจส่งผลให้ลำไส้สั้นลง รวมทั้งเซลล์เกิดการอักเสบ และมีอาการบวมน้ำ มีผลให้ไส้ตันมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ซึ่งผลที่ได้นี้ต่างจากการทดลองโดยกลุ่มที่ได้รับยาต้านบิดมีน้ำหนักไส้ตันสูงกว่าทุกกลุ่ม สาเหตุอาจเป็นเพราะขณะชั่งน้ำหนักนั้นได้ชั่งรวม cecal content ด้วย ค่าที่ได้อาจไม่ใช่น้ำหนักไส้ตันที่แท้จริงนัก

การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

จากผลการศึกษาพบว่า ในวันที่ให้เชื้อ (0 DPI) ไก่ทดลองทุกกลุ่มมีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 26-29% แต่หลังจากได้รับเชื้อไปแล้ว 6 วัน กลุ่มที่ได้รับสมุนไพรทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับยาต้านบิด แต่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้สมุนไพรหรือยาต้านบิด ซึ่งกลุ่มที่ใช้ยาต้านบิดให้ค่าดังกล่าวดีที่สุด (33%) ส่วนไก่ที่ไม่ได้รับสมุนไพรหรือยาต้านบิดในอาหารให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำกว่าทุกกลุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(25%) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อบิดชนิด *E. tenella* มีผลให้เกิดจุดเลือดออกที่ไส้ตัน ทำให้เกิดการสูญเสียเลือด รวมทั้งโภชนะต่างๆ ออกจากร่างกาย อาจสูงถึง 7-10% ของน้ำหนักร่างกาย จึงทำให้ปริมาณเม็ดเลือดแดงในร่างกายน้อยลง (Witlock, 1983) และอาจสังเกตได้จากเลือดที่ปะปนออกมากับอุจจาระสัตว์ป่วย ดังเช่นรายงานของ Conway *et al.* (1993) ที่ได้ศึกษาผลการป้อนเชื้อบิด *E. tenella* (10^5 โอโอซีสต์) ต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในร่างกายไก่ (อายุ 21 วัน) ผลปรากฏว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดไปแล้ว 6 วัน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดต่ำลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ (19.0 vs. 28.2%) Karim *et al.* (1994) ป้อนเชื้อ *E. tenella* (10^4 โอโอซีสต์) ในไก่เนื้ออายุ 10 วัน พบว่า หลังจากป้อนเชื้อไป 7 วัน ร้อยละของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าลดลงจากกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ (16.4 vs. 36.0) ส่วน Yvore *et al.* (1980) พบว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยาต้านบิด มีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นหลังจากได้รับเชื้อ 7 วัน (อายุ 20 วัน) เท่ากับ 23.8% มีค่าสูงขึ้นหลังได้รับเชื้อ 14 วัน (31.9%)

จากข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้ประเมินผลของสมุนไพรต่อการเกิดโรคบิดได้ กล่าวคือ การใช้สมุนไพรถึงแม้จะไม่มีผลในการรักษาได้เท่ากับการใช้ยาต้านบิด (ให้ค่าคะแนนรอยโรคสูงกว่าและมีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำกว่าในวันที่ 6 หลังการป้อนเชื้อ) แต่สามารถใช้ลดวิการหรือระดับความรุนแรงของการเกิดโรคได้ในระดับหนึ่ง โดยในสมุนไพรแต่ละชนิดต่างก็มีสารออกฤทธิ์ที่คาดว่าจะมีผลลดอาการท้องเดินหรือเป็นบิด ที่ทำให้เนื้อเยื่อผนังลำไส้มีการระคายเนื่องจากเชื้อโรค ลำไส้เกิดการบีบตัวมากกว่าปกติ จึงถ่ายอุจจาระบ่อยๆ ในส่วนของกระชายที่มีผลลดอาการดังกล่าว เนื่องจากสาร cineole ในเหง้ากระชาย ซึ่งมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ รวมทั้งมีฤทธิ์ลดการอักเสบจากการเข้าทำลายเซลล์ลำไส้ของเชื้อ โดยสาร 5,7-dimethoxyflavone ที่ไปยับยั้งการสังเคราะห์ postaglandin (Tasneeyakul, 1984) ในเหง้าไพลก็มีสารที่ทำให้กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วนปลายคลายตัวเช่นกัน โดยไปยับยั้งการออกฤทธิ์ของ histamine, acetylcholine และ serotonin ที่มีต่อกล้ามเนื้อ (สมภพ, 2543) และในใบฝรั่งซึ่งประกอบด้วยสารแทนนินประมาณ 8-15% ส่วนสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่สำคัญคือ สารเคอร์ซีติน (quercetin) ประมาณ 0.36% (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2541; Ayensu and Edward, 1981) สารแทนนินนี้เมื่อสัมผัสกับผนังลำไส้ จะรวมตัวกับโปรตีนที่ผิวเนื้อเยื่อแล้วตกตะกอนเคลือบเนื้อเยื่อไว้ ทำให้ลดการระคายเคืองจึงสามารถหยุดการถ่ายอุจจาระได้ หรืออาจช่วยป้องกันเนื้อเยื่อชั้นในจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค ซึ่งอาจมีผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไปขัดขวางกระบวนการ oxidative phosphorylation ของตัวเชื้อ จึงไม่สามารถเข้าฝังตัวและเพิ่มจำนวนในเซลล์เนื้อเยื่อลำไส้ได้ (เชนทร์, 2547) ส่วนสารเคอร์ซีตินมีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัว ซึ่งถูก hydrolyzed ในระบบทางเดินอาหาร ไปยับยั้งการหลั่ง acetylcholine มีผลลดการบีบตัวของลำไส้ (gastrointestinal tract) (Jaiarj *et al.*, 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อย่างไรก็ดีกลไกการยับยั้งดังกล่าวยังไม่สามารถหาเหตุผลที่ชัดเจนมาอธิบายได้ แต่สามารถใช้เป็นสมมติฐานเบื้องต้นในการศึกษาได้

เมื่อพิจารณาผลของสมุนไพรต่อค่าคะแนนรอยโรคในวันที่ 6 และ 12 หลังการป้อนเชื้อ พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีรอยโรคลดลง โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับกระชายระดับสูง (EC_{50}) และไพลระดับต่ำ (EC_1) ซึ่งไม่พบวิการเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับยาต้านบิด ชี้ให้เห็นว่าสมุนไพรทุกชนิดมีผลช่วยสมานแผลที่ถูกทำลายเนื่องจากเชื้อบิดได้ดีเทียบเท่ากับการใช้ยาต้านบิด

ผลของสมุนไพรต่อสมรรถภาพการผลิต และประสิทธิภาพการควบคุมโรคบิด (การทดลองที่ 2)

สมรรถภาพการผลิต

จากการใช้กระชาย ไพล หรือใบฝรั่ง 2 ระดับ คือ 1 และ 3% ของสูตรอาหารไก่เนื้อ เปรียบเทียบกับการใช้และไม่ใช้ยาต้านบิดชนิดแอมโพรเลี่ยม ผลปรากฏว่า การใช้ไพลระดับสูง (3%) ให้น้ำหนักตัวเพิ่มด้อยกว่าทุกกลุ่ม เนื่องจากไก่กินอาหารได้น้อย จึงทำให้ได้รับโภชนะต่างๆ เช่น โปรตีน เมทไธโอนีน ไลซีน และ ME น้อยลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารด้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการที่ไก่กินอาหารได้น้อยลงนี้อาจเนื่องมาจากในไพลมีสารที่เรียกว่า ketone volatile oil ที่ชื่อว่า Shogaol ทำให้ไพลมีรสเผ็ดร้อน และมีกลิ่นฉุน (พเยาว์, 2537) ส่งผลให้อาหารมีความน่ากินลดลง ซึ่งนับว่าเป็นข้อจำกัดของการใช้สมุนไพรเหล่านี้ในสูตรอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการผลิตเชิงอุตสาหกรรมที่ต้องการให้ไก่โตเร็ว ดังนั้นจึงควรหาวิธีประยุกต์การใช้สมุนไพรให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมต่อไป สำหรับอัตราการตายไม่ปรากฏว่ามีความแตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มว่ากลุ่มควบคุมลบซึ่งไม่มียาต้านบิดหรือสมุนไพรมีอัตราการตายสูงกว่ากลุ่มอื่น

เมื่อแยกพิจารณาในแต่ละช่วงอายุการเจริญของไก่ พบว่า สามารถใช้ใบฝรั่งและกระชายได้ที่ระดับ 1% ในไก่ช่วงอายุ 2-6 สัปดาห์ ส่วนสัปดาห์ที่ 7 สามารถใช้ใบฝรั่งได้สูงขึ้นเป็น 3% โดยไม่มีผลเสียต่อสมรรถภาพการผลิต เนื่องจากช่วงสัปดาห์สุดท้ายไก่มีความต้องการพลังงานและโปรตีนลดลงประกอบกับระบบย่อยอาหารของไก่สมบูรณ์ขึ้น จึงสามารถย่อยใบฝรั่งได้มากกว่าช่วงอายุน้อย ผลที่ได้นี้แตกต่างจากการทดลองของเชนทร์ (2547) ที่พบว่า การเสริมใบฝรั่งผงระดับ 3% ในอาหารไก่เนื้อเป็นระดับที่สูงเกินไป มีผลให้น้ำหนักตัวไก่ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีปริมาณสารแทนนินในอาหารสูง ซึ่งมีผลไปลดหรือขัดขวางการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะต่างๆ ภายในร่างกายสัตว์ ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของไก่

เปอร์เซ็นต์ซากและอวัยวะภายใน

สำหรับผลด้านคุณภาพซาก พบว่า กลุ่มที่เสริมสมุนไพรชนิดไพลและใบฝรั่งในอาหารมีเปอร์เซ็นต์เนื้ออกต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากไก่กลุ่มที่ได้รับไพลมีการกินอาหารน้อย ดังนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์เนื้ออกจึงน้อยตามไปด้วย ส่วนใบฝรั่งให้ผลสอดคล้องกับ เชนทร์ (2547) ที่พบว่า การใช้ใบฝรั่งระดับ 3% ในอาหารไก่เนื้อ มีแนวโน้มให้เนื้ออกต่ำ ซึ่งน่าจะเกิดเนื่องจากสารแทนนินที่มีอยู่สูงในใบฝรั่ง โดยสารแทนนินดังกล่าวมีความสามารถในการจับกับโปรตีนทั้งในอาหารและลำไส้ เมื่อแทนนินจับกับโปรตีนจะได้สารประกอบที่เรียกว่า tannin-protein โดยเชื่อมด้วยพันธะ H-bond ระหว่างหมู่ phenolic ของสารแทนนินกับหมู่ ketomide ของโปรตีน และบางครั้งจะเกิดจากการเชื่อมกันระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ คือ ส่วนวงแหวนของแทนนิน (aromatic ring) กับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบ tannin-protein สามารถเปลี่ยนแปลงได้ อย่างไรก็ตามถ้าโปรตีนและแทนนินมาพบกันในสภาพเป็นด่าง (อัลคาไลน์) และที่มีออกซิเจน ส่วนของ polyphenol เมื่อถูกออกซิไดซ์จะได้เป็นสารควิโนน เชื่อมต่อด้วยพันธะโควาเลนท์กับ nucleophelic amino acid เช่น ไลซีน หรือซิสเตอีน จะได้สารประกอบ tannin-protein ที่เปลี่ยนกลับไม่ได้ การเกิดพันธะ 2 รูปแบบนี้ ขึ้นกับขนาดโมเลกุลของโปรตีน และโครงสร้างของกรดอะมิโน พบว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เมื่อจับกับสารแทนนินแล้ว โปรตีนมักใช้ประโยชน์ไม่ได้ (Perez *et al*., 1995) ดังนั้นจึงอาจทำให้การนำโปรตีนและกรดอะมิโนไปผลิตเป็นเนื้อได้น้อยลง แต่ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนสำหรับกลไกของสารแทนนินที่มีในใบฝรั่ง นอกจากนี้สารแทนนินถ้าถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารในระดับสูงอาจทำให้เกิดพิษต่อตับ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักของตับที่เพิ่มขึ้น (เอมมนัส และคณะ, 2538) เช่นเดียวกับผลการทดลองที่พบว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับใบฝรั่ง 3% มีแนวโน้มให้น้ำหนักตับสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า การใช้ใบฝรั่งที่ระดับ 3% ในอาหารไก่เนื้ออาจมีพิษต่อตับ ไม่ควรใช้ในระดับที่สูงกว่านี้

การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และค่าคะแนนรอยโรค

ค่าทางโลหิตวิทยาเป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นถึงสุขภาพของสัตว์ หากมีค่าเปลี่ยนแปลงไปมากอาจบ่งบอกถึงความผิดปกติด้านสุขภาพของร่างกาย โดยปกติแล้วค่าทางโลหิตวิทยาของสัตว์แต่ละชนิดแต่ละพันธุ์จะมีค่าคงตัวและอาจเปลี่ยนแปลงไปได้ตามสภาพแวดล้อมของการดำรงชีพ ซึ่งจากการทดลอง พบว่า กลุ่มที่ได้รับใบฝรั่งมีแนวโน้มให้ค่า hematocrit สูงที่สุด อย่างไรก็ดี ค่าดังกล่าวในทุกกลุ่มก็ยังคงอยู่ในเกณฑ์ปกติ คือมีค่าอยู่ในช่วง 22.0-35.0% (Jan, 1993)

เนื่องจากในการทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของสมุนไพรเพื่อควบคุมโรคบิดที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ไม่ได้ป้อนเชื้อให้ไก่แต่อย่างใด ดังนั้น ค่าคะแนนรอยโรคจึงไม่สูงนัก เพราะไม่ได้มีการเกิดโรคแบบเฉียบพลัน จากผลการทดลอง พบว่า ค่าคะแนนรอยโรคทุกกลุ่มการทดลองมีค่าไม่ถึง 1 (ไก่อายุ 6-7 สัปดาห์) โดยกลุ่มที่ได้รับใบฝรั่งระดับ 3% ให้ค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ยาต้านบิด ซึ่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มสมุนไพรอื่นแต่ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้ทั้งสมุนไพรและยาต้านบิด ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า การใช้สมุนไพรมีผลควบคุมโรคได้ใกล้เคียงกับการใช้ยาต้านบิด (ชนิดแอมโพรเลี่ยม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากมีแนวโน้มทำให้ไก่มีสุขภาพดี ซึ่งสังเกตได้จากร้อยละปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในไก่กลุ่มที่ให้สมุนไพรทุกชนิดให้ค่าดีกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้สมุนไพรและยาต้านบิด แต่ทั้งนี้ต้องนำผลด้านสมรรถภาพการผลิตมาพิจารณาระดับการใช้ในอาหารไก่เนื้อด้วย

ในการวินิจฉัยโรคส่วนใหญ่มักใช้วิธี Gross lesion scores (GLS) หรือการอ่านค่าคะแนนรอยโรค และ Microscopic lesion scores (MLS) หรือการตัดชิ้นเนื้อลำไส้ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาถึงเนื้อเยื่อชั้น mucosa ที่ถูกทำลายไป ซึ่งวิธีหลังนี้มีความแม่นยำมากกว่า แต่ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีแรกซึ่งเป็นวิธีที่สามารถบอกถึงความแตกต่างและความรุนแรงของโรคได้ แม้จะมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง ไม่แม่นยำเท่ากับการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ก็ตาม นอกจากนี้ยังมีจุดอ่อนในแง่ที่ว่าค่าคะแนนรอยโรคอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับการประเมินด้วยสายตาของผู้อ่าน (Idris *et al*., 1997, Goodwin *et al*., 1998) อย่างไรก็ดีระดับคะแนน lesion scores ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักตัวเสมอไป นั่นหมายความว่า ไก่ที่มีค่าคะแนนรอยโรคสูง อาจจะมีน้ำหนักตัวมากกว่าไก่ที่มีค่าคะแนนต่ำกว่าก็เป็นได้ ทั้งนี้เนื่องจากค่าคะแนนรอยโรคเป็นเพียงตัวชี้วัดระดับความรุนแรงของโรคเท่านั้น (Conway *et al*., 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สมุนไพรทั้ง 3 ชนิด (กระชาย ไพล และใบฝรั่ง) ที่ใช้ในการศึกษา มีแนวโน้มในการรักษาโรคบิดได้ แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาต้านบิดชนิดแอมโพรเลี่ยม เพราะเมื่อใช้สมุนไพรดังกล่าวผสมในอาหารเลี้ยงไก่ที่ได้รับการป้อนเชื้อบิด *E. tenella* พบว่า ค่าคะแนนรอยโรคในไส้ตันของไก่ที่ได้รับสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพรหรือยาต้านบิด แต่ด้อยกว่ากลุ่มที่ใช้ยาต้านบิดในอาหาร โดยกลุ่มที่ให้ใบฝรั่งมีค่าคะแนนรอยโรคสูงกว่ากระชายและไพล อย่างไรก็ดี สมุนไพรทุกชนิด มีฤทธิ์ช่วยสมานแผลที่เกิดจากการทำลายเซลล์ลำไส้ของเชื้อบิดได้ ดังจะเห็นได้จากค่าคะแนนรอยโรคที่ต่ำลง (จากคะแนน 1-2.5 เป็น 0-1) หลังจากไก่ได้รับเชื้อไปแล้ว 12 วัน

สิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการใช้สมุนไพรคือ ความปลอดภัย ส่วนใหญ่มักจะประเมินจากค่าความเป็นพิษ (toxicity values) รูปแบบต่างๆ โดยการทดลองนี้ได้พิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่มีผลต่อเซลล์ตัวอ่อนไก่ร้อยละ 50 (effective concentration 50; EC_{50}) จากการทำ primary cell culture พบว่า ไพลมีความปลอดภัยมากที่สุด เนื่องจากมีค่า EC_{50} สูงที่สุด (0.436 ก./มล.) รองลงมาคือ กระชาย ส่วนใบฝรั่งมีความปลอดภัยใกล้เคียงกับยาต้านบิด แต่เนื่องจากไพลมีกลิ่นฉุนรุนแรง เมื่อนำมาใช้ในระดับ 3% ของสูตรอาหาร มีผลทำให้สมรรถภาพการผลิตของไก่ที่อายุ 7 สัปดาห์ ด้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ และมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ซากด้อยกว่าด้วย ดังนั้นจึงไม่ควรใช้หรือใช้ในระดับต่ำกว่านี้ ส่วนกระชายแม้จะมีความปลอดภัยในระดับรองลงมา แต่การใช้ที่ระดับสูง (3%) ทำให้อัตราแลกน้ำหนักด้อยลงเช่นกัน ส่วนใบฝรั่งแม้จะมีความปลอดภัยใกล้เคียงกับยาต้านบิด แต่การใช้ในอาหารระดับสูง (3%) ไม่ส่งผลเสียต่อสมรรถภาพการผลิต อีกทั้งยังมีแนวโน้มในการควบคุมโรคบิดได้ โดยมีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและค่าคะแนนรอยโรคใกล้เคียงกับกลุ่มที่ใช้ยาต้านบิด จึงเป็นสมุนไพรที่น่าจะนำมาใช้ แต่เนื่องจากเยื่อใยสูง (30.9% DM) ถ้าใช้ในรูปของสารสกัดน่าจะช่วยลดปัญหาเรื่องเยื่อใยได้

อย่างไรก็ดี ข้อมูลที่ได้นี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ควรทำการทดสอบสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวต่อเชื้อบิด เพื่อให้ได้ค่า EC_{50} ซึ่งนำมาคำนวณหาค่า TI (therapeutic index) เพื่อประเมินศักยภาพในการใช้เป็นยาของสมุนไพรต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved