

ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูในการบรรเทา
อาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียงในสัตว์ทดลอง

**BIOACTIVITIES OF CLOVE FLOWER BUD OIL AND EXTRACT
ON RELIEVING MIGRAINE AND RELATED SYMPTOMS
IN LABORATORY ANIMALS**

กันยารัตน์ ศีกษากิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกทานตะวันในการบรรเทา
อาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียงในสัตว์ทดลอง

กันยารัตน์ ศึกษากิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูในการบรรเทาอาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียงในสัตว์ทดลอง
Bioactivities of Clove Flower Bud Oil and Extract on Relieving Migraine and Related Symptoms in Laboratory Animals

ชื่อ – นามสกุล นางสาวกัญยรัตน์ ศึกษากิจ


สาขาวิชา ชีววิทยาประยุกต์


อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์นพรัตน์ พุทธกาล, วท.ค.

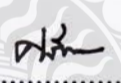
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์กฤติยา ทิสยากร, Ph.D.


ปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

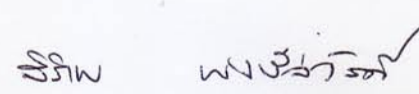

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์คลนภา แก้วภา, ป.ค.)


..... กรรมการ
(อาจารย์กฤติยา ทิสยากร, Ph.D.)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สพญ.ศศิรา คุปพิทยานันท์, Ph.D.)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นพรัตน์ พุทธกาล, วท.ค.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สิริแะ พงษ์สวัสดิ์, วท.ค.)

วันที่ 16 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2558

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูในการบรรเทาอาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียงในสัตว์ทดลอง
ชื่อ – นามสกุล	นางสาวกันยรัตน์ ศึกษากิจ
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์นพรัตน์ พุทธกาล, วท.ค.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์กฤติยา ทิสยากร, Ph.D.
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

ไมเกรน (Migraine) เป็นโรคปวดศีรษะชนิดหนึ่งที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทที่หลอดเลือดแดงบริเวณศีรษะ โดยมีกลุ่มเซลล์ประสาทจำเพาะเจาะจงเรียกว่า Trigeminal nucleus ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการปวดไมเกรนจะปล่อยสารกลุ่ม Neuropeptide ได้แก่ Serotonin มีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัวและอักเสบจึงทำให้เกิดอาการปวดไมเกรน ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูในการบรรเทาอาการปวดและอาการข้างเคียงที่เกิดจากไมเกรน ได้แก่ การผ่อนคลาย นอนหลับ ด้านการอักเสบ รวมถึงศึกษาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ในเซรัมและสมองของสัตว์ทดลอง

ในการศึกษาค้นคว้านี้ทำการกลั่นน้ำมันกานพลูจากดอกกานพลูแห้งด้วยเครื่องกลั่นด้วยน้ำ ส่วนสารสกัดดอกกานพลูทำการสกัดด้วยเอทานอล จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง ได้แก่ ทดสอบฤทธิ์บรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Tail flick test และ Hot plate test ทดสอบฤทธิ์ในการนอนหลับและผ่อนคลายด้วยวิธี Sleeping time และ Muscle relaxant activity ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema และ Carrageenan-induced rat paw edema ทดสอบฤทธิ์ต่อระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ด้วยวิธี Reserpine-induced low serotonin level รวมถึงการวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และติดตามโปรตีน Serotonin ชนิด 1B receptor (5-HT_{1B}R) ด้วยวิธี Western blotting technique ผลการทดลองพบว่าน้ำมันดอกกานพลู 5% น้ำหนัก/น้ำหนัก ใน Gel base และสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Tail flick test และเมื่อทดสอบด้วยวิธี Hot plate test โดยใช้ Serotonin และ Capsaicin ที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อนที่มากกว่าปกติ พบว่าเมื่อใช้ Serotonin ความเข้มข้น 0.1 นาโนโมล/

ไมโครลิตร ในการเหนี่ยวนำ สารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้เช่นเดียวกับยา Sumatriptan ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว และเมื่อนำเซรั่มของสัตว์ทดลองมาวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin โดยวิธี ELISA พบว่า สารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 และ 750 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว สามารถลดระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ที่บริเวณระบบประสาทส่วนปลายได้ เช่นเดียวกับยา Sumatriptan ส่วนการใช้ Capsaicin ในการเหนี่ยวนำ สารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว สามารถออกฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้เช่นเดียวกับยา Ibuprofen ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว โดยที่ยา Sumatriptan ไม่สามารถออกฤทธิ์บรรเทาอาการปวดที่เกิดจาก Capsaicin ได้ แสดงให้เห็นว่ากลไกของ Sumatriptan และ Capsaicin อาจจะไม่มีความเกี่ยวข้องกัน ส่วนการศึกษาหาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ในสมองของหนูทดลองที่ได้รับ Reserpine ขนาด 0.25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว เป็นเวลา 9 วัน เพื่อเหนี่ยวนำให้ระดับของ Serotonin ลดลง พบว่าสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 และ 750 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว สามารถช่วยเพิ่มระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ได้เช่นเดียวกับยา Sumatriptan และเมื่อตรวจหาโปรตีน 5-HT_{1B}R ที่มีขนาด 47 กิโลดาลตัน ด้วยวิธี Western blotting technique ยังพบว่าสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 และ 750 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว มีขนาดความเข้มและความหนาของ band มากกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่าน้ำมันดอกกานพลูทุกความเข้มข้น (1%, 7.5% และ 15% ปริมาตร/ปริมาตร ในอะซีโตน) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยสามารถลดการบวมของใบหูหนูทดลองได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema ในขณะที่สารสกัดจากดอกกานพลูขนาด 250, 500 และ 750 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยสามารถลดการบวมของอุ้งเท้าหนูได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทำให้เกิดอาการง่วง หลับ และคลายกล้ามเนื้อ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Sleeping time และ Muscle relaxant activity

ดังนั้น ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพและกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูที่เกี่ยวข้องกับอาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ เช่น ฤทธิ์ในการนอนหลับและผ่อนคลาย

คำสำคัญ: ฤทธิ์ทางชีวภาพ, กานพลู, ไมเกรน, สัตว์ทดลอง, ซีโรโทนิน

Thesis Title	Bioactivities of Clove Flower Bud Oil and Extract on Relieving Migraine and Related Symptoms in Laboratory Animals
Name-Surname	Miss Kanyarat Sueksakit
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Assistant Professor Nopparat Buddhakala, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Mrs. Krittiya Thisayakorn, Ph.D.
Academic Year	2014

ABSTRACT

Migraine is a neurovascular disorder. Trigeminal nucleus in trigeminal nerve release neuropeptide such as serotonin. An increase in serotonin levels causes vasodilation and neurogenic inflammation leading to migraine. Therefore, the objectives of this research were to determine the bioactivity of clove flower bud oil and its extract on relieving migraine and related symptoms such as relaxation, hypnosis, anti-inflammation, and to evaluate serotonin levels in serum and brain of laboratory animals.

In this study, clove oil obtained from dry of clove flower buds by hydro-distillation. Clove flower bud extract was extracted with ethanol. The bioactivities of clove flower bud oil and its extract was tested in laboratory animals such as analgesic effect were treated with tail flick test and hot plate test. Hypnotic and muscle relaxant effect were treated with sleeping time and muscle relaxant activity methods. Anti-inflammatory effects were treated with EPP-induced rat ear edema and carrageenan-induced rat paw edema methods. Reserpine-induced low serotonin level method was used for determination of serotonin levels. An examination of 5-HT_{1B}R expression used western blotting technique. The results showed that 5% w/w clove flower bud oil in gel base and 500 mg/kg/body weight (bw) clove flower bud extract had high potency in analgesic activity evaluated by tail flick test. In serotonin and capsaicin-evoked thermal hyperalgesia experiments using hot plate test, it was found that 500 mg/kg/bw clove flower bud extract showed analgesic activity as well as 100 mg/kg/bw sumatriptan when animal were injected with 0.1 nmol/ μ l of serotonin. Serotonin levels

were determined in the serum with ELISA technique. 500 and 750 mg/kg/bw clove flower bud extract decreased the levels of serotonin in peripheral nervous system, as well as sumatriptan. While inducing thermal hyperalgesia with capsaicin, 500 mg/kg/bw clove flower bud extract and 100 mg/kg/bw ibuprofen exhibited analgesic effect, but sumatriptan did not. In addition, it was found that the mechanism of sumatriptan may not be related to capsaicin. In order to induce low serotonin level, rats were treated with 0.25 mg/kg/bw reserpine for 9 days. 500 and 750 mg/kg/bw of clove flower bud extract increased serotonin level, as well as sumatriptan did. The examination of 5-HT_{1B}R expression at 47 kDa using western blotting technique revealed darker and thicker band from 500 and 750 mg/kg/bw clove flower bud extract than the control group. All concentrations of clove flower bud oil (1%, 7.5%, and 15% v/v in acetone) showed that it activated an anti-inflammatory effect in ear thickness tested on EPP-induced rat ear edema method was decreased. In addition, 250, 500, and 750 mg/kg/bw clove flower bud extract showed the anti-inflammatory effect by decreased in paw volume tested on carrageenan-induced rat paw edema method. Moreover, all doses of the extracts revealed the effects of sedation, hypnotic, and muscle relaxation tested by sleeping time and muscle relaxant activity methods.

Therefore, these results suggest that the bioactivities and mechanisms of action of clove flower bud oil and its extract related to migraine and associated symptoms. This plant can be useful to treat in a variety of disease such as hypnotic and relaxant effects.

Keywords: bioactivity, clove, migraine, laboratory animals, serotonin

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ด้วยความเมตตาช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ดร.คลนภา แก้วภา ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ สพญ.ดร. ศจีรา คุปพิทยานันท์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาเสียสละเวลา ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ข้อเสนอแนะ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งให้กำลังใจและความห่วงใยตลอดระยะเวลาการศึกษาวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพรัตน์ พุทธกาล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.กฤติยา ทิษยากร ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ในทุกๆ เรื่อง สอนทักษะการปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลอง แก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งดูแล ให้กำลังใจและความห่วงใยตลอดระยะเวลาการศึกษาวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับผู้วิจัย

ขอขอบคุณ โครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก และฝ่ายเกษตร และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย รวมทั้งอำนวยความสะดวกทั้งด้านสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวิเชียร เขยนอก คุณกาญจนา สีแยม คุณดรณี ปะหุสี คุณปณิดา ชมะวรรณ และคุณยุทธนา ทิพาพงษ์ศกพันธ์ ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิจัย ให้คำปรึกษา คำแนะนำ รวมทั้งกำลังใจและให้ความห่วงใยตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณสำนักบัณฑิตศึกษา ที่ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในด้านเอกสารต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อนิพัทธ์ คุณแม่สำนวน ศึกษากิจ และญาติพี่น้องผู้เป็นที่รัก ผู้ซึ่งคอยห่วงใย ให้กำลังใจ ให้โอกาสและสนับสนุนทุนในการศึกษาอันมีค่ายิ่ง

ความดีอันเกิดจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา ครูอาจารย์ ญาติพี่น้อง ผู้มีพระคุณทุกท่าน สถาบันการศึกษาทุกระดับที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาซึ่งมีส่วนร่วมในการวางรากฐานการศึกษา อบรม ให้การสนับสนุนผู้วิจัยตลอดมา และขออุทิศแด่สัตว์ทดลองทุกชีวิตที่มีส่วนสำคัญต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความกรุณาอันดีจากทุกท่านที่กล่าว นามมาและขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

กัญยรัตน์ ศึกษากิจ

สารบัญ

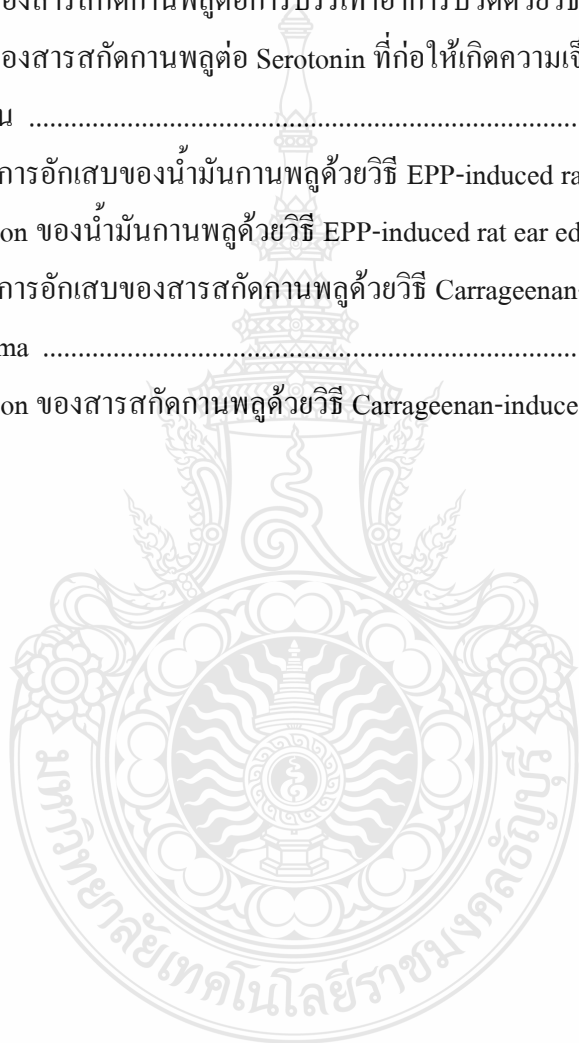
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	15
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	15
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	17
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	17
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ	18
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
2.1 ไมเกรน.....	19
2.2 การรักษาอาการปวดศีรษะไมเกรน.....	23
2.3 Serotonin	25
2.4 ความเจ็บปวด	27
2.5 การอักเสบ	30
2.6 การนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อ.....	32
2.7 กานพลู	33
2.8 การวิเคราะห์หาระดับของโปรตีนและตรวจติดตาม โปรตีนที่สนใจ.....	37
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	42
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	46
3.1 สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	46
3.2 สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทำวิจัย	49
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	50
3.4 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	69

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	70
4.1 ผลของน้ำมันและสารสกัดกานพลูในการบรรเทาอาการปวด	70
4.2 ผลของสารสกัดกานพลูต่อระดับสารสื่อประสาท Serotonin	80
4.3 ผลการตรวจติดตามโปรตีน 5-HT _{1B} ด้วยวิธี Western blotting technique	84
4.4 ผลของสารสกัดกานพลูต่อการนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อ ..	85
4.5 ผลของน้ำมันและสารสกัดกานพลูในการต้านการอักเสบ	89
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	93
5.1 สรุปผลการวิจัย	93
5.2 ข้อเสนอแนะ	99
บรรณานุกรม	100
ภาคผนวก	112
ภาคผนวก ก	113
ภาคผนวก ข	119
ภาคผนวก ค	123
ประวัติผู้เขียน	130

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่พบในส่วนต่างๆ ของกานพลู	35
ตารางที่ 4.1 %MPE ของน้ำมันกานพลูต่อการบรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Tail flick test	72
ตารางที่ 4.2 %MPE ของสารสกัดกานพลูต่อการบรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Tail flick test	74
ตารางที่ 4.3 %MPE ของสารสกัดกานพลูต่อ Serotonin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน	76
ตารางที่ 4.4ฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันกานพลูด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema	89
ตารางที่ 4.5 %inhibition ของน้ำมันกานพลูด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema	90
ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema	91
ตารางที่ 4.7 %inhibition ของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema	91



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาบรรเทาอาการปวดไมเกรนในกลุ่ม 5-HT agonist ..	24
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ Serotonin	25
ภาพที่ 2.3 กลไกการทำงานของ Serotonin	26
ภาพที่ 2.4 กลไกการเกิดความเจ็บปวด	29
ภาพที่ 2.5 กระบวนการสร้าง Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	31
ภาพที่ 2.6 ลักษณะทั่วไปของกานพลู	34
ภาพที่ 2.7 Direct ELISA	37
ภาพที่ 2.8 Indirect ELISA	38
ภาพที่ 2.9 Sandwich ELISA	38
ภาพที่ 2.10 Competitive ELISA	39
ภาพที่ 2.11 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Western blotting technique	41
ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสมอง	62
ภาพที่ 3.2 Gel electrophoresis	66
ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการย้ายโปรตีนลงแผ่น Membrane โดยใช้ iBlot Dry Transfer System	67
ภาพที่ 3.4 หลักการ Transfer โปรตีนสู่แผ่น Membrane	68
ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการ Blocking	68
ภาพที่ 4.1 ฤทธิ์บรรเทาอาการปวดของน้ำมันกานพลูด้วยวิธี Tail flick test	70
ภาพที่ 4.2 ฤทธิ์บรรเทาอาการปวดของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Tail flick test	73
ภาพที่ 4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อ Serotonin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน	75
ภาพที่ 4.4 ฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อ Capsaicin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน	78
ภาพที่ 4.5 ผลของสารสกัดกานพลูต่อระดับสารสื่อประสาท Serotonin ใน Serum ของ สัตว์ทดลองจากการทดลอง Serotonin-evoked thermal hyperalgesia	80
ภาพที่ 4.6 ผลของสารสกัดกานพลูต่อระดับสารสื่อประสาท Serotonin ในสมองของสัตว์ ทดลองจากการทดลอง Reserpine-induced low serotonin level	82
ภาพที่ 4.7 การแสดงออกของโปรตีน 5HT _{1B} R ด้วยวิธี Western blotting technique	84

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.8 Onset ของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Sleeping time	85
ภาพที่ 4.9 Duration time ของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Sleeping time	86
ภาพที่ 4.10 ผลของสารสกัดกานพลูต่อระยะเวลา (วินาที) ที่สัตว์ทดลองสามารถเดินบน Rota rod	88
ภาพที่ 5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาชาเฉพาะที่และน้ำมันกานพลู	93
ภาพที่ 5.2 กลไกการออกฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดของยากลุ่ม NSAIDs และสารสกัดจากดอกกานพลู	94
ภาพที่ 5.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Sumatriptan และสารสกัดกานพลูต่อการลดระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ที่ระบบประสาทส่วนปลาย เมื่อวิเคราะห์จาก Serum ของสัตว์ทดลอง	95
ภาพที่ 5.4 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม NSAIDs และสารสกัดจากดอกกานพลูในการบรรเทาอาการปวดที่เกิดจาก Capsaicin	96
ภาพที่ 5.5 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Sumatriptan และสารสกัดจากดอกกานพลูต่อการเพิ่มระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ในสมองของสัตว์ทดลอง	97
ภาพที่ 5.6 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม Benzodiazepine และสารสกัดจากดอกกานพลูต่อการนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อของสัตว์ทดลอง	98
ภาพที่ 1ก เครื่องกลั่นด้วยน้ำ (Hydro-distillation)	114
ภาพที่ 2ก เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator)	114
ภาพที่ 3ก เครื่อง Tail flick meter	115
ภาพที่ 4ก อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์บรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Hot plate test	115
ภาพที่ 5ก Pocket thickness gauge	115
ภาพที่ 6ก เครื่อง Rota rod	116
ภาพที่ 7ก เครื่อง Plethysmometer	116
ภาพที่ 8ก อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ ELISA	117
ภาพที่ 9ก เครื่อง Microplate reader	117
ภาพที่ 10ก อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ Western blotting	118
ภาพที่ 11ก ชุด Gel Electrophoresis XCell SureLock™ Mini-Cell	118

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 12ก ชุด iBlot™ Gel Transfer Device	118
ภาพที่ 1ข การเลี้ยงและดูแลหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rat	120
ภาพที่ 2ข การเลี้ยงและดูแลหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ ICR Mouse	121
ภาพที่ 3ข การชั่งน้ำหนักหนู Rat และ หนู Mice	122
ภาพที่ 1ค ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ป้อนให้สัตว์ทดลอง	125



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

w/w	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
w/v	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร
mg/kg/bw	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว
g	กรัม
μl	ไมโครลิตร
nm	นาโนเมตร
kDa	กิโลดาลตัน
Agonists	ยาที่จับกับ receptor แล้วมีการตอบสนอง
Antagonists	ยาที่จับกับ receptor แล้วต้านการตอบสนองต่อ agonists
5-HT _{1B} R	5-hydroxytryptamine (Serotonin) ชนิด 1B receptor
CGRP	Calcitonin gene related peptide
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
COX	Cyclooxygenase
PGE ₂	Prostaglandin
GABA	Gamma amino butyric acid
MWOA	Migraine without aura
MWA	Migraine with aura
PBZ	Phenylbutazone
EPP	Ethyl phenylpropiolate
%MPE	%Maximal Possible Effect
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
CE	Clove extract
PBS buffer	Phosphate Buffer Saline
RIPA buffer	Radio Immuno Precipitation Assay Buffer

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไมเกรน (Migraine) เป็นโรคปวดศีรษะชนิดหนึ่ง อาการของโรคเกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทที่หลอดเลือดแดงบริเวณศีรษะ ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังไม่หายขาดและเป็นโรคที่ซับซ้อนของสมองที่ต้องแก้ไขในระดับกลไก [1] ส่วนใหญ่ที่พบเป็นการปวดไมเกรนแบบเรื้อรัง [2,3] ทำให้มีผลกระทบต่อกิจกรรมในชีวิตประจำวัน เนื่องจากมีอิทธิพลต่อคุณภาพชีวิตและการทำงาน [4] ซึ่งในทางพยาธิสรีรวิทยาของไมเกรนยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทของไฮออนบริเวณก้านสมองนำไปสู่การลดลงของเลือดในสมองและเกิดการปล่อยสารกลุ่ม Neuropeptides เช่น Calcitonin gene related peptide (CGRP) [5] และ Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) [6] ออกมาจากปลายประสาท Trigeminal ซึ่งหากในสมองมีระดับของ Serotonin น้อยจะก่อให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดนอกกะโหลกศีรษะและหลอดเลือดแดงใหญ่ในกะโหลกศีรษะ การขยายตัวของหลอดเลือดนี้จะช่วยกระตุ้น Trigeminovascular system ซึ่งเป็นระบบที่มีความสำคัญนำไปสู่การเกิดอาการปวดศีรษะและอาการที่เกี่ยวข้อง (Associated symptoms) อื่นได้ [7]

วิธีการรักษาทางคลินิกของอาการปวดศีรษะไมเกรนหากเป็นรุนแรงและบ่อยครั้งแพทย์จึงแนะนำยาที่มีเป้าหมายเพื่อลดอาการ ความรุนแรง และระยะเวลาของอาการปวด โดยการรักษาด้วยยาแผนปัจจุบันมี 2 ประเภท คือ 1) ยารักษาอาการปวดในระยะเฉียบพลัน ได้แก่ ยาแก้อักเสบชนิดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) ซึ่งจะออกฤทธิ์โดยยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) ส่งผลให้ไม่สามารถสร้างสาร Prostaglandin ที่เป็นสารสื่อการอักเสบ จึงลดการอักเสบได้, Ergot เป็นยาชนิด Nonselective 5-HT receptor agonists ทำให้หลอดเลือดในสมองเกิดการหดตัว และ Triptans เป็นยาชนิด Selective 5-HT receptor agonists ทำให้หลอดเลือดในสมองหดตัว เนื่องจากเป็น Selective จึงไม่ไปกระตุ้น Receptor อื่นที่ทำให้เกิดการคลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น และ 2) ยาป้องกันการปวดไมเกรน ได้แก่ ยากลุ่ม Antidepressant จะยับยั้งการคืนกลับของ Norepinephrine และ Serotonin ส่งผลให้เพิ่มระดับของสารสื่อประสาททั้งสองตัวนี้ [8], Beta-blockers ช่วยปรับสมดุลของ Catecholamine ป้องกันโดยการลดความถี่ ความรุนแรง และระยะเวลาปวด [9], Calcium channel blockers ช่วยปรับการทำงานของสารสื่อประสาท ลดความถี่ของการเกิดอาการปวดไมเกรน [10], Serotonin antagonists โดยยาในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ที่ Serotonin receptor มากกว่าตำแหน่งอื่น [11] และกลุ่ม Anticonvulsants เป็นยาด้านและป้องกันอาการชัก ช่วยคลายกล้ามเนื้อ เพิ่มการทำงานของ

Gamma amino butyric acid (GABA) [12] จะออกฤทธิ์โดยตรงที่ GABA receptor-chloride channel complex และออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system ; CNS) ทำให้เกิดการผ่อนคลายและมีอาการง่วงซึม เป็นต้น แต่การให้ยาดังกล่าวนี้อาจมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยบางรายได้ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน คอแห้ง หัวใจเต้นช้า และความดันโลหิตต่ำ เป็นต้น [13] นอกจากนี้ยังมีวิธีการรักษาแบบเวชศาสตร์แผนจีนโดยวิธีการฝังเข็ม แต่มีข้อจำกัดของการฝังเข็มคือ สตรีมีครรภ์ โรคมะเร็งที่ไม่ได้รับการรักษา โรคหลอดเลือดแข็งตัว และโรคที่ต้องรักษาโดยการผ่าตัด ทำให้คนไข้ไม่เกรนหันมาพึ่งสมุนไพร เนื่องจากมีความปลอดภัย มีผลข้างเคียงน้อย ง่าย และราคาถูกกว่ายาแผนปัจจุบัน หากใช้ได้อย่างถูกต้องตามคำแนะนำจะมีประสิทธิภาพสูง ทำให้สามารถพึ่งตนเองได้เมื่อเจ็บป่วย ยาสมุนไพรไทยหลายชนิดสามารถบรรเทาอาการปวดและต้านการอักเสบได้ เช่น รางจืดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างสาร Nitric oxide (NO) และ Prostaglandin (PGE₂) ซึ่งเป็นสาเหตุของการอักเสบ [14] น้ำมันกานพลู (Clove oil) ใช้ในการรักษาอาการปวดฟันได้ดี เพราะมีสารยูจินอลที่มีฤทธิ์เป็นยาชาได้นานถึง 90 นาที ใบตำลึงและใบหญ้านางมีฤทธิ์ระงับปวดเมื่อทดสอบในหนูทดลอง เป็นต้น [15]

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้รักษาโรคหรือบรรเทาอาการต่างๆ อย่างกว้างขวางในทางการแพทย์หรือด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อช่วยบรรเทาอาการของโรคต่างๆ เช่น โรคความดันโลหิตต่ำ โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคมะเร็ง อาการปวด รวมทั้งรักษาแผลเรื้อรัง เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติของสารสำคัญจากพืชนับเป็นทางเลือกใหม่ที่นักวิทยาศาสตร์ยอมรับและหันมาสนใจพืชสมุนไพรเพื่อสุขภาพมากขึ้น

กานพลู (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr.&L.M.Perry) เป็นพืชในวงศ์ Myrtaceae ในตำราพืชสมุนไพรรายงานว่ากานพลูมีสรรพคุณมากมาย เช่น เป็นยาแก้ปวดฟัน แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่และต้านเชื้อแบคทีเรีย [16-19] จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกานพลูพบว่ามีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ Eugenol, trans-Caryophyllene และ α -Caryophyllene [20] เช่นเดียวกับการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Formalin induced paw edema พบว่าสารสกัดดอกกานพลูจากเอทานอล 200 mg/kg มีฤทธิ์ช่วยลดการบวมของอุ้งเท้าหนูได้ และจากการทดสอบฤทธิ์บรรเทาปวดด้วยวิธี Acetic acid induced abdominal writhing contraction สารสกัดกานพลู 50 mg/kg มีฤทธิ์บรรเทาปวดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับยา Piroxicam 20 mg/kg [21]

ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูด้วยเอทานอลมาทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการบรรเทาอาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียง ได้แก่ ฤทธิ์ผ่อนคลาย นอนหลับ และต้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาการปวดไมเกรนในสัตว์ทดลอง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูในการบรรเทาอาการปวดและอาการข้างเคียงที่เกิดจากไมเกรน ได้แก่ ฤทธิ์ผ่อนคลาย นอนหลับ และต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง

1.2.2 เพื่อวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาการปวดไมเกรนใน Serum และสมองของสัตว์ทดลอง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 พืชสมุนไพรที่ใช้ทดสอบคือ กานพลู โดยนำดอกกานพลูแห้งไปกลั่นน้ำมันกานพลู ณ ศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสกัดสารด้วยเอทานอลเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ ณ ห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

1.3.2 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลู ดังนี้

1.3.2.1 ศึกษาฤทธิ์บรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Tail flick test และ Hot plate test

1.3.2.2 ศึกษาฤทธิ์ในการนอนหลับด้วยวิธี Sleeping time และศึกษาความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อด้วยวิธี Muscle relaxant activity

1.3.2.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Rat ear edema และ Rat paw edema

1.3.2.4 ศึกษาฤทธิ์ต่อสารสื่อประสาท Serotonin ในสัตว์ทดลองด้วยวิธี Reserpine-induced low serotonin levels test

1.3.2.5 วิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ใน Serum และสมองของสัตว์ทดลองด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และติดตามโปรตีน 5-HT_{1B}R ด้วยวิธี Western blotting technique

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.4.1 ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลู เพื่อใช้เป็นตัวเลือกในการบรรเทาอาการปวดและอาการข้างเคียงที่เกิดจากไมเกรน ได้แก่ ฤทธิ์ผ่อนคลาย นอนหลับ และต้านการอักเสบ

1.4.2 เข้าใจถึงระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาการปวดไมเกรนใน Serum และสมองของสัตว์ทดลอง

1.4.3 เป็นแนวทางสำหรับการศึกษาต่อเกี่ยวกับผลของน้ำมันและสารสกัดดอกกานพลู ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ช่วยบรรเทาอาการปวดและอาการข้างเคียงที่เกิดจากไมเกรน



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไมเกรน

ไมเกรน เป็นอาการปวดศีรษะที่ทรมาณและเรื้อรัง ซึ่งเป็นอาการที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง พบในประชากรทั่วไปประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ของคนที่เป็นไมเกรน พบว่ามีค่าเฉลี่ยการปวด 1-2 ครั้งต่อเดือน [1, 22-23] มีอาการปวดตุ๊บๆ ข้างเดียว อาจจะสลับซ้ายขวาได้ แต่น้อยรายที่จะปวดพร้อมกันทั้งสองข้าง ซึ่งอาการเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อกิจกรรมและการทำงานในชีวิตประจำวัน โดยไมเกรนจะปวดเป็นเวลานาน 4-72 ชั่วโมง ผู้หญิงและผู้ชายเป็นไมเกรนได้ทั้งสองเพศ แต่ผู้หญิงจะพบบ่อยกว่าเพราะมีฮอร์โมนเพศแต่ละรอบเดือนมาเกี่ยวข้อง เนื่องจากการเกิดไมเกรนระหว่างการมีรอบเดือนเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในร่างกาย ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของสารสื่อประสาทในสมองที่กระตุ้นให้เกิดไมเกรน การลดลงของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) เป็นช่วงที่หลอดเลือดในสมองเกิดการขยายตัวและกระตุ้นการเกิดไมเกรนในผู้หญิงบางรายได้ [24] บางคนจะปวดขณะที่มีประจำเดือนและหายไปเมื่อมีการตั้งครรภ์ เพราะขณะที่มีการตั้งครรภ์ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน (Progesterone) จะมีระดับสูงขึ้น ทำให้ผู้หญิงบางรายเกิดอาการปวดไมเกรนที่มีความสัมพันธ์กับรอบเดือน ผู้ป่วยบางรายเมื่อรับประทานยาคุมกำเนิดจะมีอาการปวดศีรษะรุนแรงและถี่ขึ้น บางรายไม่เคยเป็นไมเกรนแต่หลังจากที่รับประทานยาคุมกำเนิดก็ทำให้เกิดอาการปวดศีรษะไมเกรนขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากยารักษาไมเกรนแต่ละชนิดจะมีส่วนผสมของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนระดับต่างกัน ซึ่งฮอร์โมนดังกล่าวนี้จะมีผลไปกระตุ้นการขยายตัวของหลอดเลือดในสมองที่เป็นสาเหตุของการเกิดไมเกรน [25,26] โดยมีอาการที่เกี่ยวข้องได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน และไวต่อการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่อยู่นอกร่างกาย เช่น แสง เสียง เป็นต้น [27]

2.1.1 พยาธิสรีรวิทยา

ปัจจุบันมีการค้นพบข้อมูลเกี่ยวกับกลไกของการเกิดไมเกรนมากขึ้น ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมา มีดังนี้

2.1.1.1 ไมเกรนเกี่ยวข้องกับหลอดเลือด ทฤษฎีนี้ถูกคิดขึ้นมาในปีพ.ศ. 2483 โดย Wolff แพทย์ชาวอเมริกัน ได้อธิบายว่าอาการที่แสดงก่อนการปวดศีรษะชนิดออรั (Aura) เกิดจากหลอดเลือดในสมองมีการหดตัว และเมื่อหลอดเลือดที่หดตัวขยายตัวออกจะทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ โดยจากการสังเกตอาการในผู้ป่วยไมเกรนพบว่าขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดแดงมีการขยายตัวนำไปสู่การปวดศีรษะและอาการที่เกี่ยวข้อง โดยมีหลักฐานในการสนับสนุนคือ การพบหลอดเลือดนอกกะโหลกศีรษะมีการขยายตัวและเต้นตุบๆ เมื่อมีการให้ยาที่ช่วยให้หลอดเลือดหดตัวทำให้อาการปวดศีรษะดีขึ้น ส่วนการให้ยาที่กระตุ้นการขยายตัวของหลอดเลือดทำให้อาการปวดศีรษะรุนแรงขึ้น นอกจากนี้ยบางชนิดที่ไม่มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือด แต่ก็สามารถบรรเทาอาการปวดศีรษะไมเกรนได้เช่นกัน [7, 11]

2.1.1.2 การเกิดไมเกรนเกิดจากการที่ระบบประสาทเกิดความแตกต่างของพื้นที่ในสมองขึ้น โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อระบบการส่งกระแสประสาทในสมอง ทฤษฎีนี้จึงมุ่งเน้นไปที่ภาวะซึมเศร้า ทำให้บริเวณเยื่อหุ้มสมองชั้นนอกเกิดการ Depolarization ซึ่งเป็นสาเหตุของการปวดไมเกรนชนิดออรั [28]

2.1.1.3 การเกิดไมเกรนเกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาท หลอดเลือด และการทำงานของสารสื่อประสาท โดย Leao ชาวบราซิล เป็นผู้เสนอทฤษฎีนี้ในปี พ.ศ. 2487 ได้อธิบายว่าเซลล์ประสาทในสมองบางตัวเกิดการตื่นตัวปล่อยสารสื่อประสาท (สารเคมีที่ทำหน้าที่ส่งต่อสัญญาณระหว่างเซลล์ประสาท) กระตุ้นเซลล์ประสาทข้างเคียงให้ตื่นตัว และส่งต่อสัญญาณประสาทไปเรื่อยๆ เซลล์ประสาทที่ถูกกระตุ้นนี้นำมาอธิบายการเกิดอาการแสดงนำก่อนการปวดศีรษะของผู้ป่วยได้ ส่วนอาการปวดศีรษะของผู้ป่วยอธิบายได้จากการที่เซลล์ประสาทถูกกระตุ้นไปเรื่อยๆ และมีการกระตุ้นกลุ่มเซลล์ประสาทที่จำเพาะเจาะจง เรียกว่า Trigeminal nucleus ซึ่งจะปล่อยสารเคมีหลายชนิดที่มีผลก่อให้เกิดอาการปวดและการอักเสบของหลอดเลือด เช่น สารกลุ่ม Neuropeptide จากรบบประสาท Trigeminal นอกจากสารเคมีกลุ่มนี้ที่ก่อให้เกิดอาการปวดแล้วยังมีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัวอีกด้วย

นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่าการเกิดไมเกรนมีสาเหตุมาจากเซลล์ประสาทในก้านสมอง (ทำหน้าที่ควบคุมการหายใจ การทำงานของหัวใจ หลอดเลือด และความรู้สึกเจ็บปวด) ในสมองส่วนทาลามัส (Thalamus ; สมองส่วนกลางที่ควบคุมสมดุลการรับรู้ความรู้สึกของร่างกาย เช่น เสียง แสง และการได้ยิน) และมีการค้นพบว่าสารสื่อประสาทบางตัวคือ โดปามีน (Dopamine) และซีโรโทนิน

(Serotonin) ที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดอาการต่างๆ ของการปวดไมเกรน อีกทั้งยังพบยาที่ ยับยั้งการทำงานของสารสื่อประสาทที่ช่วยบรรเทาและรักษาอาการปวดศีรษะไมเกรนได้อีกด้วย [23, 29-30]

2.1.2 อาการของการปวดไมเกรน

อาการปวดศีรษะไมเกรนสามารถแบ่งตามอาการนำก่อนการปวดศีรษะได้เป็น 2 กลุ่ม [7] ได้แก่

2.1.2.1 Migraine without aura (MWOA) หรือ Common migraine จะพบประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วย ซึ่งจะไม่มีอาการผิดปกติทางสายตา ก่อนการปวดศีรษะ โดยจะปวดเป็นเวลา 4-72 ชั่วโมง ปวดข้างเดียว ความรุนแรงอยู่ในระดับปานกลาง อาการมักกำเริบตอนขึ้นลงบันได ขณะออกกำลังกายหรือช่วงที่ทำงานหนักและจะมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น

2.1.2.2 Migraine with aura (MWA) หรือ Classic migraine จะพบประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วย ซึ่งจะมีอาการผิดปกติมาก่อนการปวดศีรษะประมาณ 1 ชั่วโมง เช่น เห็นแสง ชักแชนก ไรต่อแสง เสียง และกลิ่นที่ผิดปกติอันไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้ยังมีอาการเหมือนกับ Migraine without aura ร่วมด้วย

2.1.3 อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกของไมเกรน [31] แบ่งออกเป็น 5 ระยะ ดังนี้

2.1.3.1 ระยะอาการนำที่เกิดขึ้นก่อนการปวดศีรษะ (Prodrome) จะพบก่อนมีอาการปวดศีรษะภายใน 24 ชั่วโมง เช่น อาการหิว อ่อนเพลีย หงุดหงิด ท้องเสีย ไม่มีสมาธิ เหม็นกลิ่นอาหาร เป็นต้น ซึ่งอาการเหล่านี้จะพบประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยไมเกรน

2.1.3.2 ระยะออรั (Aura) ระยะนี้จะพบก่อนการปวดศีรษะประมาณ 1 ชั่วโมง และมักพบอาการผิดปกติทางสายตา เช่น เกิดเมือมองวัตถุ เห็นภาพผิดขนาด เห็นแสงชักแชนก มองเห็นเป็น เส้นคลื่น ซึ่งอาการเหล่านี้จะพบประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยไมเกรน

2.1.3.3 ระยะปวดศีรษะ (Headache) มีอาการปวดศีรษะแบบจุกๆ ส่วนใหญ่จะปวดข้างเดียว แต่ก็สามารถปวดสองข้างได้เช่นกันในผู้ป่วยบางราย จะปวดเป็นระยะเวลา 4-72 ชั่วโมง โดยมักมีอาการเหล่านี้ร่วมด้วย ได้แก่ ปวดกระบอกตา ปวดต้นคอ คลื่นไส้ อาเจียน กลัวแสง กลัวเสียง เป็นต้น

2.1.3.4 ระยะเวลาปวดศีรษะ (Resolution) อาการปวดศีรษะมักจะหายไปหลังจากที่ได้พักผ่อน เช่น นอนหลับ

2.1.3.5 ระยะเวลาหลังจากการหายปวดศีรษะ (Postdrome) เป็นอาการที่หายจากการปวดศีรษะ แต่ร่างกายมีอาการอ่อนล้า ความคิดไม่แล่น เฉื่อยเมย จึงควรที่จะนอนพัก เพื่อให้สมองได้เกิดการผ่อนคลาย

2.1.4 ปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดอาการปวดไมเกรน

ปัจจัยของการเกิดไมเกรนมีหลายสาเหตุ ผู้ป่วยแต่ละรายจะมีปัจจัยกระตุ้นการปวดแตกต่างกัน ซึ่งปัจจัยกระตุ้นเหล่านั้น [32,33] ได้แก่

2.1.4.1 เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Alcohol triggers) เช่น ไวน์ เบียร์ สามารถก่อให้เกิดอาการปวดไมเกรนในบางรายได้

2.1.4.2 กาแฟและเครื่องดื่มที่มีคาเฟอีน (Coffee and other caffeinated drinks) โดยคาเฟอีนเพียงเล็กน้อยจะสามารถลดอาการปวดศีรษะในบางรายได้ แต่ในทางกลับกันหากมีปริมาณมาก อาจทำให้เกิดอาการปวดได้เช่นกัน เพราะหลังจากดื่มในช่วงแรกคาเฟอีนจะทำให้หลอดเลือดหดตัวและคลายอาการปวดศีรษะ แต่เมื่อดื่มมากเกินไปจะทำให้หลอดเลือดขยายตัวและจะกระตุ้นให้เกิดอาการปวดศีรษะได้

2.1.4.3 วัตถุเจือปนในอาหาร (Food additives) สารบางอย่างอาจก่อให้เกิดการปวดศีรษะในผู้ที่ไวต่อการตอบสนอง เช่น ผงชูรส (Monosodium glutamate), Phenylethylamine (PEA) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีอยู่ในซอสโกเลตหรือโกโก้, Nitrate ได้แก่ ดินประสิวโดยใช้เป็นสารกันบูดในอาหารประเภทไส้กรอก แฮม เบคอน หรืออาหารรมควันต่างๆ และ Tyramine เป็นองค์ประกอบของอาหาร เช่น ประเภทเนยแข็ง (Cheese) และสารให้ความหวานแทนน้ำตาล (Aspartame) เป็นต้น

2.1.4.4 พืชสกุลส้ม (Citrus) เช่น ส้ม เกรปฟรุต มะนาว สับปะรด และน้ำผลไม้ กลิ่นของผลไม้เหล่านี้ อาจเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอาการปวดไมเกรน แต่การปวดไมเกรนจากสาเหตุนี้จะพบเป็นจำนวนน้อย

2.1.4.5 ระดับฮอร์โมน เมื่อระดับของฮอร์โมนเปลี่ยนแปลงจะกระตุ้นให้เกิดอาการปวดศีรษะได้ เช่น ช่วงที่มีประจำเดือน รับประทานยาเม็ดคุมกำเนิด และขณะตั้งครรภ์ เป็นต้น

2.1.4.6 สภาพร่างกาย เช่น การที่ร่างกายพักผ่อนไม่เพียงพอ เครียด ทำงานหนัก และการอดอาหาร อาจเป็นปัจจัยกระตุ้นให้เกิดอาการปวดศีรษะได้

2.1.4.7 การออกกำลังกาย การที่ร่างกายออกกำลังกายมากเกินไป ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดการกำเริบของอาการปวดไมเกรนได้

2.1.4.8 สภาวะแวดล้อม เช่น อากาศร้อนหรือหนาวจัด แดดจ้า มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ บางอย่าง เช่น กลิ่นบุหรี่หรือกลิ่นน้ำหอม เป็นต้น

2.2 การรักษาอาการปวดศีรษะไมเกรน

วิธีการรักษาทางคลินิกของอาการปวดศีรษะไมเกรนหากเป็นรุนแรงและบ่อย แพทย์จึงแนะนำยาที่มีเป้าหมายเพื่อลดอาการ ความรุนแรง และระยะเวลาของการปวด โดยรักษาด้วยยาแผนปัจจุบัน ซึ่งมี 2 ประเภท ดังนี้

2.2.1 ยารักษาอาการปวดในระยะเฉียบพลัน

ยาในกลุ่มนี้จะใช้เมื่อมีอาการปวดศีรษะ ซึ่งยาในกลุ่มนี้ ได้แก่

2.2.1.1 ยาแก้อักเสบชนิดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) เช่น Ibuprofen, Naproxen sodium และ Paracetamol เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) ที่ส่งผลไม่ให้เกิดการสร้าง Prostaglandin ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบจึงลดการอักเสบได้ [34]

2.2.1.2 Ergot เช่น Cafergot เป็น Nonselective 5-HT receptor agonists ทำให้หลอดเลือดในสมองหดตัวจึงลดอาการปวดศีรษะได้ [35, 36]

2.2.1.3 Triptans เช่น Sumatriptan และ Zolmitriptan เป็น Selective 5-HT receptor agonists ยานี้จะจับกับ Serotonin receptors ที่บริเวณเส้นเลือดและเส้นประสาทที่อยู่รอบๆ เส้นเลือด ทำให้หลอดเลือดในสมองหดตัวและบรรเทาอาการปวดศีรษะได้ [37, 38]

2.2.2 ยาป้องกันอาการปวดศีรษะไมเกรน

การเลือกใช้ยาในกลุ่มนี้ควรพิจารณาจากอาการต่างๆ ได้แก่ ใช้เมื่อมีอาการมากกว่า 3 ครั้งต่อสัปดาห์ รับประทานดำเนินชีวิตและอาการปวดมีแนวโน้มรุนแรงขึ้น หรือระยะเวลาที่ปวดแต่ละครั้งนานขึ้น ซึ่งชนิดของยาป้องกันอาการปวดศีรษะไมเกรน ได้แก่

2.2.2.1 ยาในกลุ่ม Antidepressant เช่น Amitriptyline ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาอาการซึมเศร้า โดยจะออกฤทธิ์ยับยั้งการคืนกลับของ Norepinephrine และ Serotonin ส่งผลในการช่วยเพิ่มระดับของสารสื่อประสาททั้งสองตัวนี้ [8]

2.2.2.2 β -blocker เช่น Propranolol และ Atenolol เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้จะช่วยปรับสมดุลของ Catecholamine ออกฤทธิ์ป้องกันอาการปวดศีรษะไมเกรนโดยลดความถี่ ความรุนแรง และระยะเวลาปวด [9]

2.2.2.3 Calcium channel blockers เช่น Flunarizine จะช่วยลดการทำงานของสารสื่อประสาทและช่วยลดความถี่ของการเกิดอาการปวดไมเกรน [10]

2.2.2.4 Serotonin antagonists เช่น Granisetron (5-HT_3 receptor antagonist) เป็นยาที่ใช้ป้องกันอาการคลื่นไส้ อาเจียน โดยจะออกฤทธิ์ที่ Serotonin receptor มากกว่าตำแหน่งอื่นและจะต้านการจับของ 5-HT_3 receptor จึงไม่ก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน [11]

2.2.2.5 Anticonvulsants เช่น Phenobarbital และ Diazepam เป็นต้น เป็นยาช่วยเพิ่มการทำงานของ GABA ซึ่งออกฤทธิ์โดยตรงที่ GABA receptor chloride channel complex [12]

2.2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยาบรรเทาอาการปวดไมเกรน

กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม 5-HT agonist ได้แก่ ยา Sumatriptan ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ ดังนี้

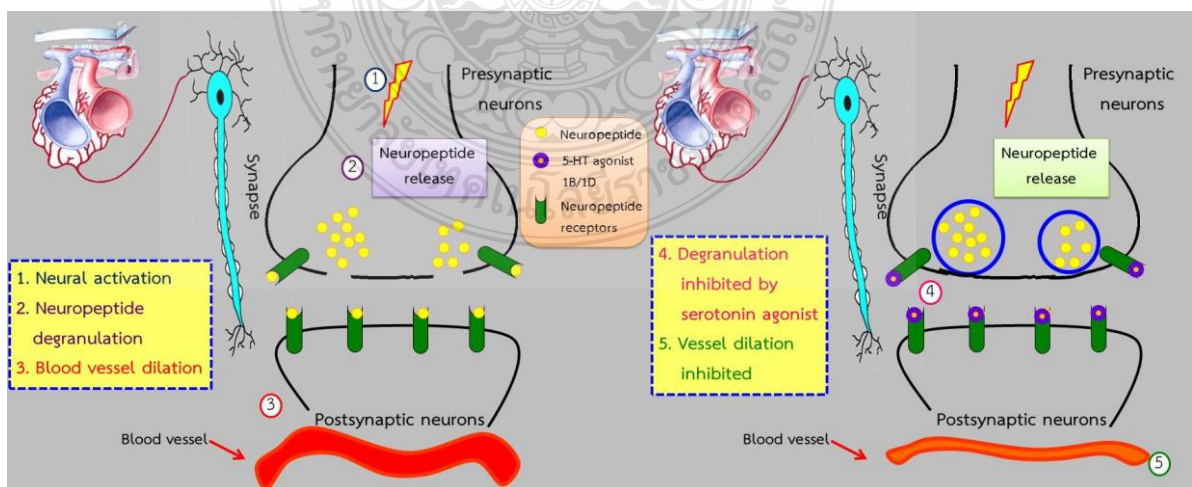
2.2.3.1 สัญญาณประสาทถูกส่งเข้ามาใน Trigeminal nucleus

2.2.3.2 เกิดการปล่อยสารกลุ่ม Neuropeptide ได้แก่ Serotonin

2.2.3.3 หลอดเลือดแดงเกิดการขยายตัวทำให้เกิดอาการปวดไมเกรน

2.2.3.4 ยับยั้งการออกฤทธิ์ของ Neuropeptide โดยยา 5-HT_{1B/1D} agonist

2.2.3.5 หลอดเลือดแดงเกิดการหดตัว ทำให้บรรเทาอาการปวดไมเกรนได้



ภาพที่ 2.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาบรรเทาอาการปวดไมเกรนในกลุ่ม 5-HT agonist [38]

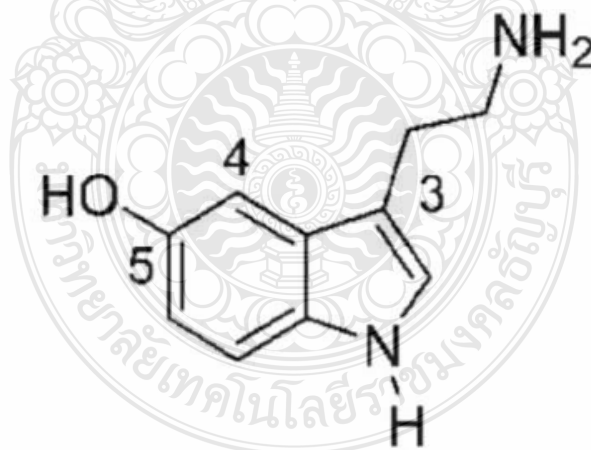
จากภาพที่ 2.1 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม agonist เช่น Sumatriptan ซึ่งออกฤทธิ์เป็น 5-hydroxytryptamine-1D (5-HT_{1D}) และ 5-HT_{1B} receptor agonist ที่หลอดเลือดอย่างจำเพาะเจาะจงโดยไม่มีผลต่อ 5-HT receptor subtypes อื่นๆ (5-HT₂₋₇) ซึ่ง 5-HT_{1D} และ 5-HT_{1B} receptor จะพบมากที่หลอดเลือดบริเวณกะโหลกศีรษะและเป็นตัวกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัว

2.3 Serotonin

2.3.1 โครงสร้างของ Serotonin

Serotonin (5-hydroxytryptamine หรือ 5-HT) เป็นสารเคมีที่มีความสำคัญที่สุดต่อการเกิดอาการปวดศีรษะไมเกรน ซึ่งหลังจากแหล่งเก็บในระหว่างการเกิดไมเกรน ส่งผลให้เกิดการหดตัวหรือขยายตัวของหลอดเลือด หากมีการกระตุ้นการหลั่งของ Serotonin จะส่งผลให้มีการเพิ่มหรือลดการไหลเวียนของเลือดในสมอง นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องโดยตรงกับการส่งผ่านความเจ็บปวดไปยังระบบต่างๆ ในร่างกาย

โครงสร้างของ Serotonin ประกอบด้วยหมู่ Hydroxyl ซึ่งจะอยู่บนวงแหวนที่ 5 ของ Indole nucleus และมี Primary amine nitrogen เป็นตัวรับ H⁺ ทำให้ Serotonin เป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และ Blood Brain Barrier (BBB) ได้



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ Serotonin [39]

ปัจจุบันมีข้อมูลเกี่ยวกับการแบ่งประเภทของตัวรับการกระตุ้น (Receptor) ของ Serotonin โดยแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ และ 5-HT₇ ซึ่งในแต่ละกลุ่มยังแบ่งเป็นกลุ่มเล็กๆ อีกมากมาย ดังนั้น ยาแต่ละชนิดจะมีผลต่อ Receptor ตัวใดตัวหนึ่งอย่างจำเพาะเจาะจง เช่น ยา Ergotamine สามารถรักษาอาการปวดศีรษะไมเกรนแบบเฉียบพลัน โดยจะออกฤทธิ์ที่ 5-HT₃ และ 5-HT_{1D} receptor ส่วนยาชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่ม Triptans จะออกฤทธิ์เป็น 5-HT_{1B} agonist ที่หลอดเลือดและ 5-HT_{1D} agonist ที่ระบบประสาทส่วนกลาง [40]

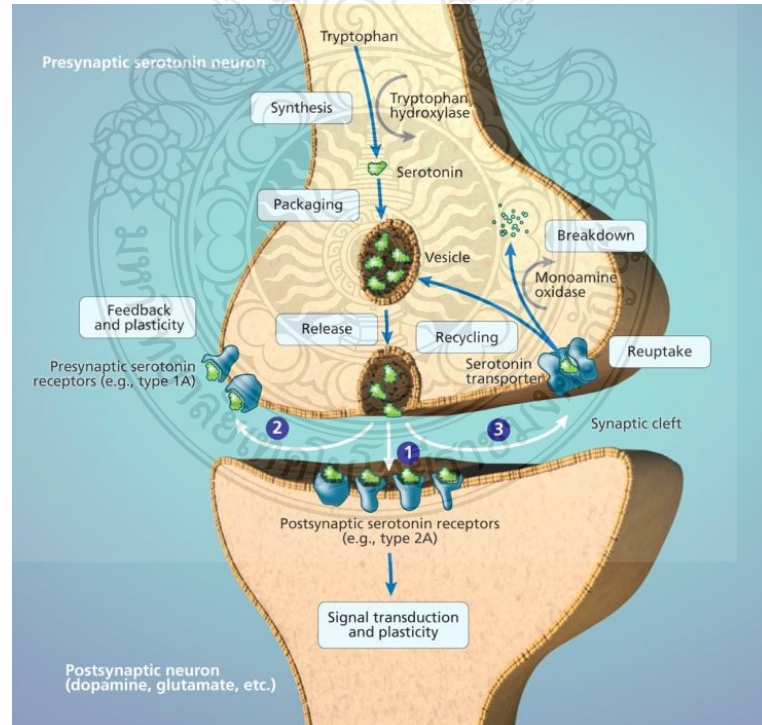
2.3.2 กลไกการทำงานของ Serotonin

กลไกการทำงานของ Serotonin แสดงดังภาพที่ 2.3 มีกลไกการทำงาน ดังนี้

2.3.2.1 เมื่อมีสัญญาณประสาทถูกส่งเข้ามาในเซลล์ Serotonin ที่เก็บอยู่ใน Vesicle จะถูกปล่อยออกมาเพื่อจับกับ Postsynaptic serotonin receptor ชนิด 2A

2.3.2.2 Serotonin กลับไปจับกับ Presynaptic serotonin receptor ชนิด 1A

2.3.2.3 การนำสารสื่อประสาท Serotonin กลับไปเก็บไว้ใน Vesicle เหมือนเดิมเพื่อทำหน้าที่ในการนำสารสื่อประสาทต่อไป



ภาพที่ 2.3 กลไกการทำงานของ Serotonin [41]

2.4 ความเจ็บปวด

ความปวด (Pain) มีลักษณะซับซ้อน เมื่อเกิดความปวดส่งผลให้เกิดอาการไม่สบายทั้งทางร่างกายและอารมณ์ มักเกี่ยวข้องกับความเสียหายของเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจเกิดขึ้นบริเวณใดบริเวณหนึ่งของร่างกาย [42] เป็นอาการสำคัญที่พบได้บ่อยมากในทุกส่วนของร่างกาย หากเป็นมากจะมีผลต่อการตอบสนอง (Reflex) ของร่างกาย ซึ่งอาจทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดบริเวณระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral vasodilation) จึงเกิดอาการหน้ามืด เป็นลม หรือช็อก และเสียชีวิตได้

เนื่องจากไมเกรนเกี่ยวข้องกับความปวด แต่ในการทดลองไม่สามารถทำให้สัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบมีอาการปวดไมเกรนได้ จึงต้องมีการศึกษาวิธีการทดลองที่ใช้เลียนแบบอาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียงต่างๆ ในสัตว์ทดลอง

2.4.1 ลักษณะของการปวด การตอบสนองต่อเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายหรือเกิดการอักเสบมี 2 แบบ [43] ดังนี้

2.4.1.1 ความรู้สึกเจ็บ (Epicritic pain) เป็นความรู้สึกที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและหายไปภายในระยะเวลาสั้น จะบอกตำแหน่งได้ชัดเจนและไม่มีการทำลายของเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นกลไกป้องกันตัวไม่ให้เกิดอันตราย เช่น เมื่อเหยียบของมีคม เป็นต้น

2.4.1.2 ความรู้สึกปวด (Protopathic pain) เป็นความรู้สึกที่เกิดหลังความรู้สึกเจ็บ ซึ่งความปวดนี้จะอยู่นาน

2.4.2 ชนิดของความปวด

ความปวดแบ่งได้หลายชนิด อาจแบ่งตามระยะเวลาในการเกิดความปวด [44] หรือแบ่งตามตำแหน่งพยาธิสรีรวิทยา [45] ดังนี้

2.4.2.1 แบ่งตามระยะเวลาของความปวด [45-46] แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1) ความปวดเฉียบพลัน (Acute pain) เป็นความปวดที่เกิดขึ้นเมื่ออวัยวะในร่างกายได้รับอันตราย จนกระทั่งบาดเจ็บและหายไป โดยระยะเวลาของความปวดจะน้อยกว่า 6 เดือน

2) ความปวดเรื้อรัง (Chronic pain) เป็นความปวดที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและตลอดเวลาหรือเวลาใดเวลาหนึ่ง มีระยะเวลาความปวดตั้งแต่ 6 เดือนขึ้นไป เช่น ความปวดจากมะเร็ง การปวดศีรษะไมเกรน แผลไฟไหม้ เป็นต้น

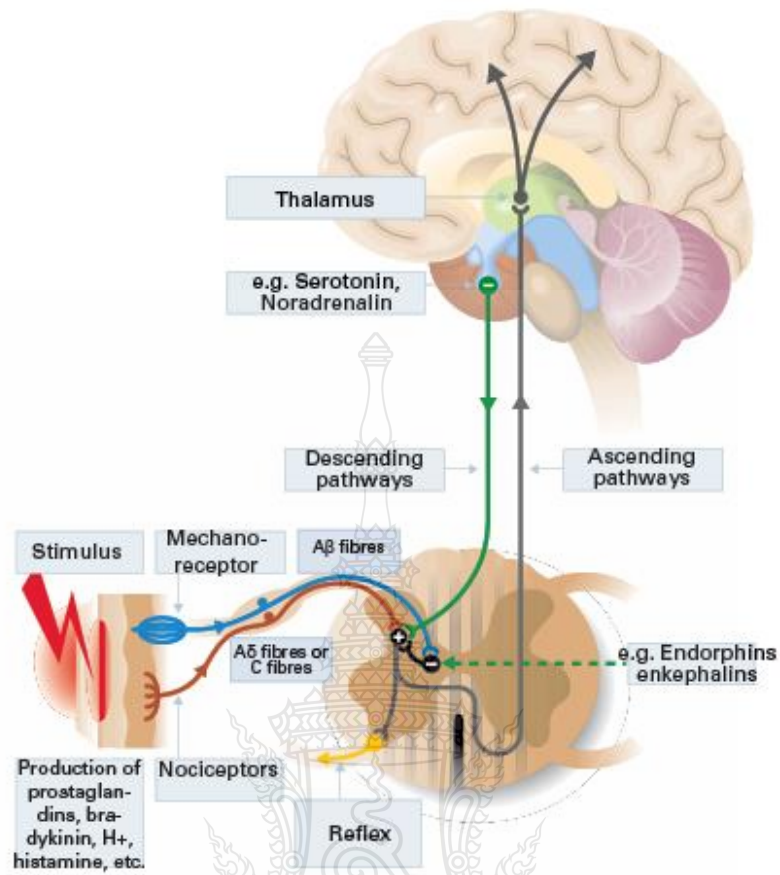
2.4.2.2 แบ่งตามตำแหน่งพยาธิสรีรวิทยา แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1) ความปวดจากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (Nociceptive pain) เป็นความปวดที่มาจากการทำงานของตัวรับความรู้สึกรวด (Nociceptors) ถูกกระตุ้น เช่น บริเวณผิวหนัง กล้ามเนื้อ กระดูก ช่องท้อง กะโหลกศีรษะ หรือทรวงอก เป็นต้น [45-47]

2) ความปวดจากการบาดเจ็บหรือการทำงานที่ผิดปกติของระบบประสาท (Neuropathic pain) ทั้งระบบประสาทส่วนปลายและส่วนกลาง ทำให้เกิดอาการปวดแบบแสบร้อน และปวดมากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นให้ปวดปกติ (Hyperalgesia) เช่น การบาดเจ็บของเส้นประสาท เป็นต้น [48]

2.4.3 กลไกการเกิดความเจ็บปวด

ความเจ็บปวดเกี่ยวข้องกับตัวรับความรู้สึกรวด สัญญาณความเจ็บปวด และสารเคมีที่เป็นตัวส่งสัญญาณ (Chemical messengers) หลายชนิด เมื่อร่างกายได้รับการบาดเจ็บจะมีตัวรับความรู้สึกรวดเฉพาะชื่อ Nociceptor ตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่ทำลายเนื้อเยื่อ สารเคมีจำนวนมากจะถูกปล่อยออกมาในบริเวณนั้น เพื่อส่งสัญญาณนี้ไปที่ตัวรับความรู้สึกรวด Nociceptor สารเคมีที่เป็นตัวส่งสัญญาณของการบาดเจ็บคือ Prostaglandin ซึ่งสารตัวนี้นอกจากจะส่งสัญญาณแล้ว ยังเพิ่มความไวต่อความเจ็บปวดของตัวรับความรู้สึกรวด Nociceptor อีกด้วย หลังจากนั้นสัญญาณนี้จะถูกส่งต่อไปยังไขสันหลัง (Spinal cord) โดยส่งผ่านทาง Myelinated fiber (เส้นประสาทที่มี myelin หุ้มอยู่) และ C fiber (เส้นประสาทที่ไม่มี myelin หุ้ม) จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังสมองส่วนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกของความเจ็บปวด ได้แก่ Thalamus และ Cerebral cortex แล้วแปลผลออกมาเป็นความเจ็บปวด [49] ดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 กลไกการเกิดความเจ็บปวด [49]

2.5 การอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกายเกิดอาการบาดเจ็บ เช่น สิ่งแปลกปลอมที่อยู่ภายนอกร่างกาย การติดเชื้อ การบาดเจ็บ หรือสารเคมี เป็นต้น [50] ซึ่งการทดลองเกี่ยวกับการปวดไมเกรนนี้ได้มีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ เนื่องจากพยาธิกำเนิดไมเกรนเกิดจากหลอดเลือดในสมองขยายตัวและเกิดการอักเสบขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุของการปวดไมเกรน จึงได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองร่วมด้วย

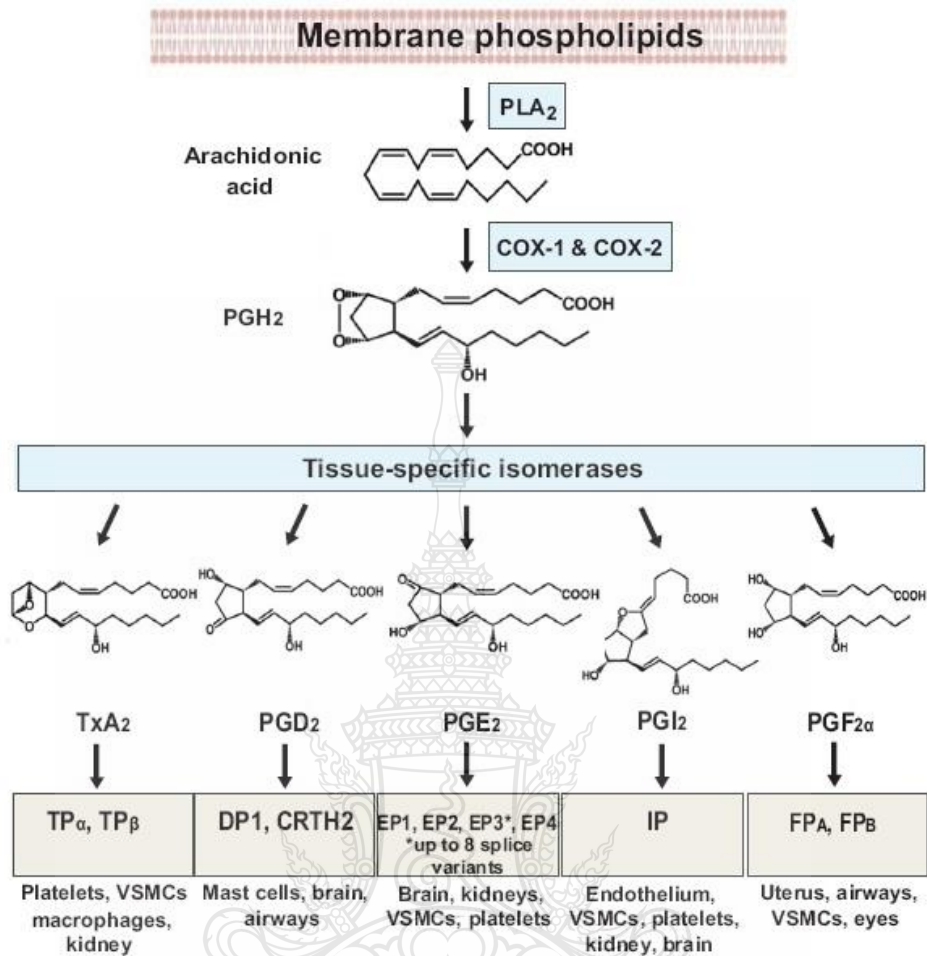
2.5.1 ชนิดของการอักเสบ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

2.5.1.1 การอักเสบชนิดเฉียบพลัน (Acute inflammation) เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นทันทีและเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ระยะเวลาสั้น จะมีอาการอักเสบในช่วงเวลาเป็นวินาที นาที ชั่วโมง หรือวัน หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้น และจะอักเสบไม่เกิน 1 สัปดาห์ ลักษณะของการอักเสบชนิดเฉียบพลัน ได้แก่ ปวด (Pain), บวม (Swelling), แดง (Redness) และร้อน (Heat) เป็นต้น [51]

2.5.1.2 การอักเสบชนิดเรื้อรัง (Chronic inflammation) เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นช้า ระยะเวลาสั้น ซึ่งขึ้นอยู่กับสาเหตุของสิ่งที่มากระตุ้น มักมีอาการอักเสบในช่วงเวลาเป็นหลายสัปดาห์ หรือหลายเดือน การอักเสบเรื้อรังมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อที่รักษาไม่หาย หรืออาจได้รับสิ่งที่เป็นอันตรายกับเนื้อเยื่อในร่างกายเป็นเวลานาน ลักษณะของการอักเสบชนิดเรื้อรัง ได้แก่ มีการสร้างเนื้อเยื่อที่เป็นพังผืดขึ้น (Fibrosis) มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบชนิด Macrophages และ Lymphocyte เป็นต้น [52]

2.5.2 กลไกการอักเสบ

การอักเสบส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดอาการบาดเจ็บ เป็นผลทำให้มีอาการปวด บวม แดง และร้อน เนื่องมาจาก Inflammatory mediator เช่น Prostaglandin E₂ (PGE₂) ที่ถูกปล่อยออกมากระตุ้นบริเวณปลายประสาท ทำให้รู้สึกปวด [53] มีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังบริเวณหลอดเลือด จึงเกิดอาการบวม และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนเลือดในหลอดเลือด ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการอักเสบมีลักษณะแดงและร้อนขึ้น [54] โดยกระบวนการสร้าง PGE₂ แสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 กระบวนการสร้าง Prostaglandin E₂ (PGE₂) [55]

จากภาพที่ 2.5 แสดงกระบวนการสร้าง PGE₂ ซึ่งเป็นสารเคมีก่อให้เกิดความเจ็บปวดและอักเสบขึ้น โดยมีกระบวนการสร้าง ดังนี้

2.5.2.1 เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นบริเวณร่างกาย เช่น เกิดการบาดเจ็บ การติดเชื้อ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวนี้จะกระตุ้นเอนไซม์ phospholipase A₂ (PLA₂) ให้เปลี่ยน Phospholipid ของ Cell membrane เป็น Arachidonic acid (AA) [56-58]

2.5.2.2 Arachidonic acid (AA) ถูกเปลี่ยนสภาพต่อโดย Cyclooxygenase pathway (COX หรือ Prostaglandin H (PGH) synthase) เป็น Prostaglandin H₂ (PGH₂) และ Thromboxane

2.5.2.3 Prostaglandin H₂ (PGH₂) จะถูกเปลี่ยนไปเป็น Prostaglandin หลายชนิด เช่น PGE₂, PGD₂ และ PGI₂ โดยเอนไซม์ PGE synthase, PGD synthase และ PGI synthase ตามลำดับ

2.6 การนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อ

การนอนหลับ (Sleep) หมายถึงสภาวะทางพฤติกรรมที่มีการรับรู้เปลี่ยนแปลงไปและมีการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลง [59] ซึ่งการนอนหลับเป็นการพักผ่อน (Rest) เนื่องจากเป็นสภาวะที่ลดการทำกิจกรรมที่ใช้กล้ามเนื้อและความคิดน้อยลง ทำให้รู้สึกคลายเครียด คลายกังวล และเกิดอาการอ่อนคลาย [60] หากมีอาการปวดไมเกรนจึงต้องให้ร่างกายอยู่ในสภาวะพักผ่อนและคลายกังวล ดังนั้น การทดลองนี้จึงต้องมีการศึกษาฤทธิ์ในการนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อของสารทดสอบต่อการนอนหลับในสัตว์ทดลอง

2.6.1 วงจรการนอนหลับ มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงเป็น 2 ระยะคือ ระยะที่ไม่มีการกลอกลูกตา (Non rapid eye movement; NREM) และระยะที่มีการกลอกลูกตา (Rapid eye movement; REM) ดังนี้ [61-62]

2.6.1.1 ระยะที่ไม่มีการกลอกลูกตา (Non rapid eye movement; NREM) แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ

- 1) ระดับ 1 เริ่มหลับ กล้ามเนื้อเริ่มผ่อนคลาย ลูกตาเคลื่อนไหวไปมาช้าๆ
- 2) ระดับ 2 หลับได้ดีขึ้น กล้ามเนื้อมีการเริ่มผ่อนคลายมากขึ้น
- 3) ระดับ 3 การหลับลึก กล้ามเนื้อมีการผ่อนคลายเต็มที่ มีการหลั่ง Growth hormone และ Serotonin
- 4) ระดับ 4 การหลับสนิท ระยะนี้สมองจะอยู่ในภาวะพักผ่อน ชีพจร ความดันโลหิต รวมถึงออกซิเจนของกล้ามเนื้อลดลง มีการหลั่ง Growth hormone มากที่สุด

2.6.1.2 ระยะที่มีการกลอกลูกตา (Rapid eye movement; REM) ในระยะนี้กล้ามเนื้อทุกส่วนของร่างกายจะมีการคลายตัวมากที่สุด แต่จะมีการกลอกของลูกตา นอกจากนี้ยังมีการหลั่งฮอร์โมน Cortisol, Glucagon และ Catecholamine

2.6.2 ความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อ (Muscle coordination) มีความสัมพันธ์กับการหลับคือขณะที่ร่างกายมีการพักผ่อน การทำงานของกล้ามเนื้อจะลดลง การควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อส่วนใหญ่หยุดการทำงานและเกิดการคลายตัว ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตและอนุรักษ์พลังงานของร่างกาย ช่วยให้เซลล์หรืออวัยวะมีการเสริมสร้างโปรตีน และฟื้นคืนสภาพทำให้ร่างกายเกิดการผ่อนคลาย [63]

2.7 กานพลู

2.7.1 การจัดลำดับทางด้านอนุกรมวิธานของกานพลู [64]

Kingdom : Plantae

Phylum : Angiosperms

Class : Eudicots

Order : Myrtales

Family : Myrtaceae

Genus : *Syzygium*

Species : *S.aromaticum*

2.7.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกานพลู

ชื่อไทย กานพลู

ชื่อสามัญ Clove, Clove tree

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry

วงศ์ MYRTACEAE

ชื่อท้องถิ่น จันจิ (ภาคเหนือ)

ลักษณะทั่วไป

ลำต้น เป็นไม้ยืนต้น ไม้ผลัดใบ สูง 5-20 เมตร เรือนยอดทึบ เป็นรูปกรวยคว่ำ แตกกิ่งต่ำ ลำต้นตั้งตรง เปลือกเรียบสีเทา มีต่อมน้ำมันมาก

ใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปใบหอก รูปรี กว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 6-13 เซนติเมตร ปลายแหลมหรือเรียวแหลม ขอบเรียบ แผ่นใบด้านบนเป็นมัน

ดอก ช่อดอกสั้น แดกแขนงออกเป็นกระจุก 3 ดอก ที่ปลายกิ่งหรือตรงซอกใบจำนวน 6-20 ดอก ก้านช่อดอกสั้นมาก แต่อาจยาวได้ถึง 1 เซนติเมตร ใบประดับรูปสามเหลี่ยม ยาว 2-3 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ โคนติดกันเป็นหลอดยาว 5-7 มิลลิเมตร กลีบดอก 4 กลีบ รูปขอบขนานหรือกลม ยาว 7-8 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำมันมาก ร่วงง่าย เกสรเพศผู้จำนวนมาก ก้านชูอับเรณูยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร ก้านเกสรเพศเมียยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร

ผล เป็นผลเดี่ยว มี 1 เมล็ด รูปรี ยาว 2-2.5 เซนติเมตร เมื่อแก่จะมีสีแดง
คล้ำ ยาว 1.5 เซนติเมตร [65]



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 2.6 ลักษณะทั่วไปของกานพลู

ก. ลำต้น [66]

ข. ใบ [67]

ค. ดอก [68]

ง. ผล [69]

การขยายพันธุ์ ชอบขึ้นในดินร่วนซุย ความชื้นสูง ขึ้นได้ดิบในที่ราบ สูงจากระดับน้ำทะเล 800-900 เมตร ปลูกในเขตร้อนทั่วโลกส่วนในประเทศไทยมีการนำมาปลูกบ้างแต่ไม่แพร่หลาย [70]

ส่วนที่นำมาใช้ ดอกตูม เปลือกต้น ใบ ผล น้ำมันหอมระเหย

สารประกอบเคมี

ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่พบในส่วนต่างๆ ของกานพลู

ส่วนของพืช	สารที่พบ	ปริมาณ
ดอก [71]	Eugenol	72-90 %
	β -caryophyllene	-
	Vanillin	-
ดอก [72]	Eugenol	71.56 %
	Eugenol acetate	8.99 %
ใบ [73]	Eugenol	94.4 %
	β -caryophyllene	2.9 %
ดอก [74]	Eugenol	24.371 mg/g
ดอก [75]	Eugenol	87.00 %
	Eugenyl acetate	8.01 %
	β -caryophyllene	3.56 %
ดอก [76]	Eugenol	82.3-91.4 %
	trans- β -caryophyllene	6.3-12.7 %

สรรพคุณ

ดอก มีรสเผ็ด แก้เลือดออกตามไรฟัน รักษาอาการปวดฟัน ช่วยดับกลิ่นปาก แก้รำมะนาด แก้เสมหะ เป็นยาทำให้ร้อนเมื่อถูกผิวหนัง มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ และเป็นยาขับน้ำคาวปลา แก้ท้องอืด อาหารไม่ย่อย คลื่นไส้ อาเจียน แก้จุกเสียด แก้ท้องเสีย เป็นต้น

ใบ แก้ปวดมวน

ผล ใช้เป็นเครื่องเทศ ช่วยให้มีกลิ่นหอม

เปลือกต้น แก้ปวดท้อง แก้ลม

น้ำมันหอมระเหยจากผล ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ แก้ปวดฟัน

ภูมิปัญญาพื้นบ้าน

- แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ขับลม และแก้ปวดท้อง

ใช้ดอกตูมของกานพลูที่โตเต็มที่ 4-6 ดอก หรือ 0.25 กรัม ดังนี้

ผู้ใหญ่ ใช้ทุบให้ซ้า ชงดื่มครั้งละครึ่งแก้ว

เด็ก ใช้ 1 ดอก ทุบแล้วใส่ลงในขวดนม

เด็กอ่อน ใช้ 1 ดอก ทุบใส่กระติกน้ำที่ไว้ใช้สำหรับชงนม

- ยาแก้ปวดฟัน สามารถนำมาใช้ได้หลายวิธี ดังนี้

- ใช้สำลีพันปลายไม้จุ่มน้ำมันกานพลูจากการกลั่นดอกตูมของกานพลู 4-5 หยด และใช้สำลีพันปลายไม้จุ่มที่ปวด ทำให้อาการปวดบรรเทาลงได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แก้รำมะนาดได้

- ใช้ดอกเดี่ยวอมไว้บริเวณที่ปวดฟันเพื่อระงับอาการปวด

- ใช้ดอกกานพลู ตำพอแหลกผสมกับเหล้าขาวเพียงเล็กน้อยพอและ โดยใช้จิ้มหรืออุดบริเวณที่ปวด

- ระงับกลิ่นปาก

- ใช้ดอกตูม 2-3 ดอก อมไว้ในปาก จะช่วยทำให้ระงับกลิ่นปากได้ [77]

2.8 การวิเคราะห์หาระดับของโปรตีนและตรวจติดตามโปรตีนที่สนใจ

ในการวิเคราะห์หาระดับของโปรตีนและติดตามโปรตีนที่สนใจ ที่นิยมใช้จะเป็นวิธีการตรวจทางชีวเคมี ใช้สำหรับตรวจหาโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่างเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ซึ่งวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ Western blotting technique เป็นต้น โดยรายละเอียดของวิธีการต่างๆ มีดังนี้

2.8.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

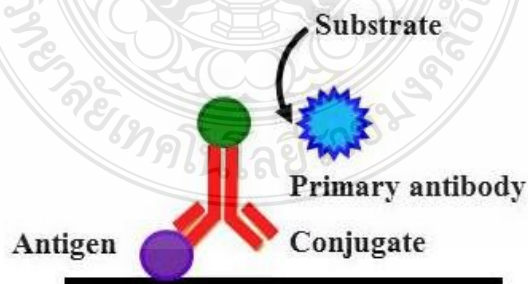
ELISA เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและรวดเร็วในการตรวจหาปริมาณโปรตีนหรือฮอร์โมนที่สนใจจากเนื้อเยื่อหรือ Serum ต่างๆ ที่ต้องการ

2.8.1.1 หลักการ

ELISA เป็นการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของ Antibody และ Antigen ที่เกาะอยู่บน Solid phase และใช้เอนไซม์ เช่น เอนไซม์ Peroxidase หรือ Alkaline phosphatase เพื่อช่วยทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (Substrate) ที่แสดงปฏิกิริยาระหว่าง Antigen กับ Antibody ซึ่ง Substrate จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ทำให้เกิดสี โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผกผันกับปริมาณโปรตีนที่ต้องการตรวจหา [78-79]

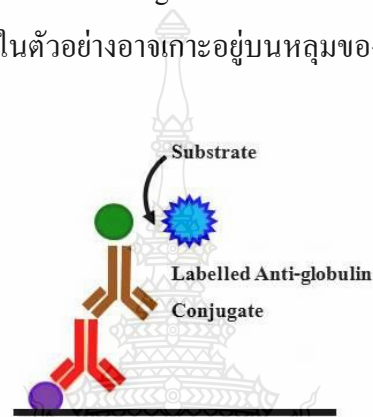
2.8.1.2 ชนิดของ ELISA [90-91]

1) Direct ELISA เป็นวิธีตรวจหา Antigen ต่างๆ โดยใช้ Primary antibody จับกับ Antigen ที่เคลือบอยู่บน Solid phase ของ Microtiter plate อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งปริมาณของ Antigen ที่ต้องการตรวจหาสามารถดูได้จากความเข้มของสีที่เกิดขึ้นหลังจากที่มีการเติม Substrate ดังภาพที่ 2.7



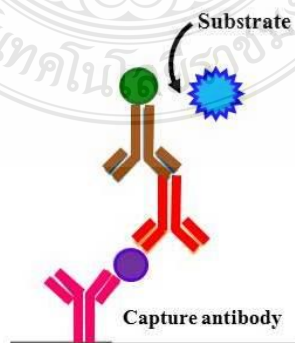
ภาพที่ 2.7 Direct ELISA [92]

2) Indirect ELISA เป็นวิธีสำหรับตรวจหา Antibody ต่างๆ โดย Antibody จะทำปฏิกิริยากับ Antigen ที่ติดอยู่กับพื้นผิวของ Solid phase และใช้ Anti-immunoglobulin ซึ่งติดฉลาก (Conjugate) ด้วยเอนไซม์ (Enzyme-labelled detector antibody) ที่ไม่ได้ติดฉลากเป็น Detector antibody แล้วตามด้วย Enzyme-labeled anti-detector antibody เข้าทำปฏิกิริยากับ Antibody ที่ต้องการตรวจหาและการย่อย Substrate จะขึ้นอยู่กับปริมาณ Antibody ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ต้องการตรวจ แต่ข้อเสียของ Indirect ELISA คือ วิธีการตรึง Antigen ไม่มีความจำเพาะเจาะจง เมื่อ Serum ถูกใช้ในการทดสอบ Antigen โปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างอาจเกาะอยู่บนหลุมของ Microtiter plate



ภาพที่ 2.8 Indirect ELISA [92]

3) Sandwich ELISA เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจหา Antigen โดยการเคลือบพื้นผิว Solid phase ด้วย Antibody ซึ่ง Antigen ในตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ Antibody จากนั้นเติม Antibody ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Enzyme-labelled detector antibody) แล้วตามด้วย Enzyme-labelled anti-detector ลงไปให้ทำปฏิกิริยา วิธีนี้ Antigen จะอยู่ตรงกลาง โดยมี Antibody ประกอบทั้งด้านบนและด้านล่าง



ภาพที่ 2.9 Sandwich ELISA [92]

4) Competitive ELISA วิธีนี้สามารถตรวจได้ทั้ง Antigen และ Antibody ถ้าต้องการตรวจ Antibody สามารถตรวจได้ 2 วิธี ดังนี้

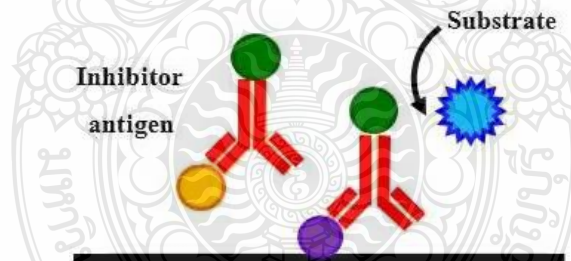
(1) เคลือบ Solid phase ด้วย Antigen จากนั้นเติม Antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ปริมาณที่แน่นอนและมีการเติมตัวอย่างที่มี Antibody อยู่ลงไป เพื่อให้เข้าไปแย่งจับกับ Antigen ที่อยู่บน Solid phase

(2) เคลือบ Solid phase ด้วย Antibody จากนั้นเติม Antigen ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์และมีการเติมตัวอย่างที่มี Antibody อยู่ลงไป เพื่อให้ Antibody ทั้งสองเข้าไปแย่งจับกับ Antigen ที่ติดฉลาก

แต่ถ้าต้องการตรวจ Antigen ก็สามารถตรวจได้ 2 วิธีเช่นกัน ดังนี้

(1) เคลือบ Solid phase ด้วย Antibody จากนั้นเติม Antigen ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ปริมาณแน่นอนและเติมตัวอย่างที่มี Antibody อยู่ลงไป เพื่อให้เข้าไปแย่งจับกับ Antibody ที่อยู่บน Solid phase

(2) เคลือบ Solid phase ด้วย Antigen จากนั้นจะเติม Antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์และมีการเติมตัวอย่างที่มี Antibody อยู่ลงไป โดยให้ Antigen ทั้งสองตัวเข้าไปแย่งจับกับ Antibody



ภาพที่ 2.10 Competitive ELISA [92]

2.8.2 Western blotting technique

Western blotting หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Immunoblot เป็นเทคนิคที่ใช้ติดตามหรือดูการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจในตัวอย่าง เช่น Tissue homogenates หรือโปรตีนที่สกัดมา [93]

2.8.2.1 หลักการ

เทคนิค Western blotting ใช้หลักการของ Gel electrophoresis ใช้แยกได้ทั้งโปรตีนที่ไม่เสียสภาพ (Non-denaturing/native protein) และโปรตีนที่เสียสภาพ (Denatured protein) โดยโปรตีนจะถูก Transfer ไปยัง Nitrocellulose membrane แล้วตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการโดยใช้ Antibody ที่มีความจำเพาะ (Specific antibody) กับโปรตีนที่ต้องการติดตาม [94]

2.8.2.2 ขั้นตอนการทดสอบ

ขั้นตอนหลักของการทดสอบมี 6 ขั้นตอน [95] ดังนี้

1) การเตรียมเนื้อเยื่อหรือโปรตีนตัวอย่าง (Tissue/Protein preparation) โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทำ Western blotting อาจมาจากเนื้อเยื่อของเซลล์หรือโปรตีนที่ทำการสกัดมาจากเนื้อเยื่อทั้งหมด ในขั้นตอนนี้จะต้องมีการเติมสาร Protease inhibitor เพื่อป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Protease ที่มีอยู่ในเซลล์

2) Gel electrophoresis เป็นการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า อาจแยกตามค่า Isoelectric point (pI) หรือแยกตามขนาดโปรตีน (Molecular weight) โดยเจลส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับแยกโปรตีน ได้แก่ Acrylamide หรือเรียกว่า Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่ง SDS เป็นสาร Ionic detergent ที่จะเข้าไปจับกับโปรตีนทำให้โปรตีนเสียสภาพและกลายเป็นประจุลบ จึงทำให้การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE เป็นการแยกโปรตีนตามขนาดของโมเลกุล

3) การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Protein transfer) เป็นการย้ายโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วย Gel electrophoresis แล้วย้ายสู่ Membrane ที่มีประจุบวก เช่น nitrocellulose หรือ Polyvinylidene fluoride (PVDF)

4) Blocking เป็นวิธีการป้องกันการเกิด Non-specific โปรตีนอื่นๆ ที่เข้ามาจับกับแผ่น Membrane โดยหลังจากย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่น Membrane โปรตีนจะจับอยู่กับแผ่น Membrane จึงต้องทำการ Blocking ด้วย Bovine serum albumin (BSA) หรือ Non-fat dry milk โดยโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของแผ่น Membrane ยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนจับอยู่แล้ว

5) การติดตามผล (Detection) จะมีการติดตามโปรตีนที่สนใจด้วย Antibody และเมื่อทำปฏิกิริยากับ Substrate จะทำให้มีสีเกิดขึ้น

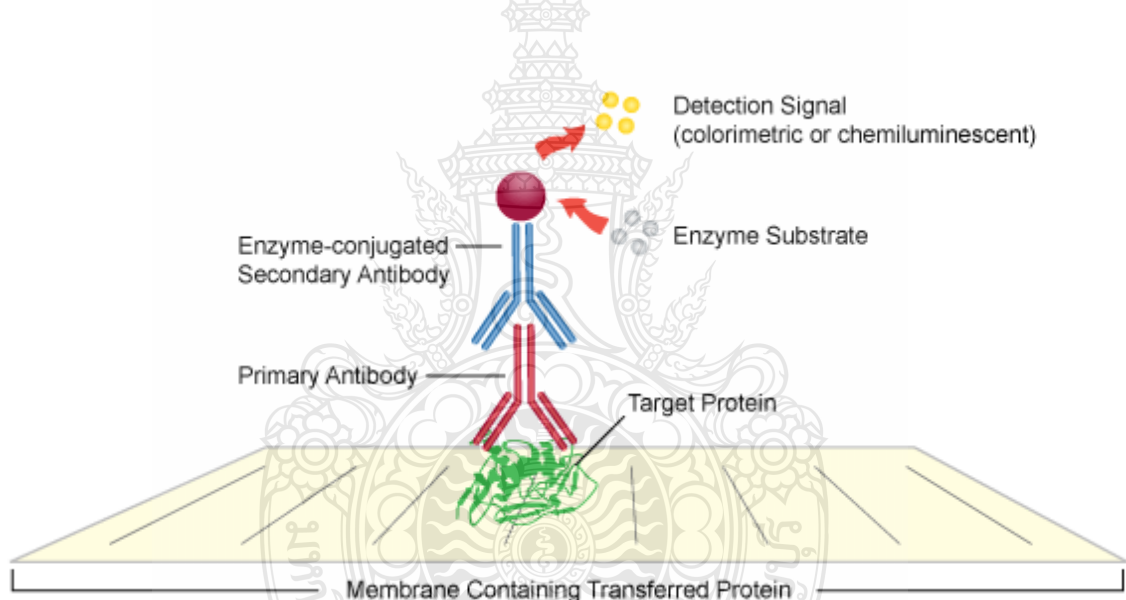
6) การวิเคราะห์ผล (Analysis) หลังจาก Incubate แผ่น Membrane ด้วย Antibody ที่มีความจำเพาะแล้ว จะติดตามว่า Antibody ไปเกาะกับโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งใด โดยการวิเคราะห์ผลขึ้นอยู่กับ Antibody ที่ใช้ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ผลแบ่งได้ ดังนี้

- Colorimetric detection โดยดูจากการเกิดสีที่เกิดจากเอนไซม์ย่อยสลาย Substrate ที่เกิดขึ้นบนแผ่น Membrane

- Chemiluminescent detection ดูจากการเรืองแสง โดยใช้ Photographic filter หรือกล้อง CCD เพื่อจับภาพของ Membrane

- Radioactive detection ดูจากการเรืองแสง เมื่อประกบกับฟิล์มเอกซเรย์

- Fluorescent detection ดูจากกล้อง Photosensor เช่น กล้อง CCD ที่มี Filter ในช่วงความยาวคลื่นที่ตรงกับสารเรืองแสงเหล่านั้นในการจับภาพ



ภาพที่ 2.11 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Western blotting technique [96]

จากภาพที่ 2.9 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Western blotting เมื่อโปรตีนเป้าหมายที่สนใจถูก Transfer ไปยัง Membrane จากนั้นจะมีการเติม Primary antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงเข้าไปจับกับโปรตีนที่สนใจ และ Incubate เพื่อให้เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ เมื่อครบตามกำหนดเวลา จึงล้างโปรตีนที่ไม่จำเพาะอื่นๆ ออก จากนั้นเติม Secondary antibody เพื่อให้จับกับ Primary antibody หลังจากนั้นจะมีการเติมสารตั้งต้น (Substrate) เพื่อดูการเกิดสีของปฏิกิริยา โดยเอนไซม์จะเข้าไปย่อยและทำปฏิกิริยากับ Substrate จึงทำให้เกิดสีขึ้นบนแผ่น Membrane

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกสาร การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกานพลูและวิธีการศึกษาเกี่ยวกับอาการปวดไมเกรนทั้งในประเทศและต่างประเทศ มีดังนี้

Alma *et al.* (2007) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดอกกานพลู โดยนำกานพลูที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามี Eugenol, Eugenyl acetate และ β -Caryophyllene เท่ากับ 87, 8.01 และ 3.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [75]

Raina *et al.* (2001) ศึกษาการกลั่นน้ำมันกานพลูจากใบแห้ง โดยทำการกลั่นน้ำมันด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำ (Hydro-distillation) ได้น้ำมันกานพลู 4.8 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC และ GC-MS พบว่ามี Eugenol และ β -Caryophyllene เท่ากับ 94.4 และ 2.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [73]

Hoque *et al.* (2008) ศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันกานพลูในการต้านเชื้อราก่อโรคที่ปนเปื้อนมาในอาหารประเภทเนื้อไก่ พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถลดการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ได้ ทำให้สามารถยืดอายุของการเก็บอาหารประเภทเนื้อไก่ได้ดียิ่งขึ้น [97]

Thirach *et al.* (2003) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูจากเอทานอลในการต้านเชื้อรา พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสาร Eugenol และ Amphotericin [98]

Tanko *et al.* (2008) ศึกษาฤทธิ์บรรเทาอาการปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดกานพลูจากเอทานอล พบว่าจากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิธี Formalin induced paw edema สารสกัดกานพลูจากเอทานอล 200 mg/kg สามารถต้านการอักเสบและลดการบวมของอุ้งเท้าหนูได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Diclofenac 25 mg/kg ส่วนการทดสอบฤทธิ์บรรเทาปวดโดยวิธี Acetic-acid induced abdominal writhing contraction สารสกัดกานพลู 50 mg/kg มีฤทธิ์ในการบรรเทาปวดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับยามาตรฐาน Piroxicam 20 mg/kg นอกจากนี้การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัดกานพลู พบว่ามีค่าของระดับความเป็นพิษที่ทำให้หนูตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Median lethal dose ; LD₅₀) เท่ากับ 565.7 mg/kg [21]

Daniel *et al.* (2008) ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและบรรเทาปวดของสารยูจีนอล (Eugenol) โดยวิธี Carrageenan-induced paw edema พบว่าสาร Eugenol ขนาด 200 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [99]

Hosseini *et al.* (2011) ศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของน้ำมันกานพลูในหนู Mice เพื่อนำไปใช้ในการบรรเทาอาการปวดฟันโดยใช้วิธี Hot plate test พบว่าน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 10% v/v สามารถบรรเทาอาการปวดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [100]

Shalaby *et al.* (2011) ศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันกานพลูในหนูขาวสายพันธุ์ Wistar rat โดยศึกษาทางโลหิตวิทยา ชีวเคมีและพยาธิสภาพระดับเนื้อเยื่อในตับและไต พบว่าน้ำมันกานพลูมีค่า LD₅₀ ที่ 3,597.5 mg/kg ซึ่งน้ำมันกานพลูมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในไต เนื่องจากมีการคั่งของเลือดดำในหลอดเลือดเล็กน้อยและเหนียวน้ำให้เกิด Desquamation (การลอกหลุดของผิว) ที่เซลล์เยื่อบุทางเดินปัสสาวะบริเวณท่อไต [101]

อนันตะเศรษฐกุล (2541) ศึกษาภาวะไวต่อไนตริกออกไซด์จากการพร่องซีโรโตนินของระบบไทรเจมมิโนวาสคูลาร์ในหนูแรทซึ่งเป็นสมมติฐานของพยาธิกำเนิดโรคไมเกรน ผลที่ได้บ่งชี้ว่าภาวะพร่องซีโรโตนินอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะตอบสนองต่อไนตริกออกไซด์มากผิดปกติในผู้ป่วยโรคปวดศีรษะไมเกรน [102]

Berman *et al.* (2006) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสาร Serotonin ในปมประสาท Trigeminal ของหนูเทศเมียที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ Serotonin เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบที่มีอยู่และการถูกควบคุมโดยการเปลี่ยนแปลงของระดับสเตียรอยด์ในรังไข่ที่เกิดขึ้นระหว่างรอบการเป็นสัด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปวดไมเกรนที่มีสาเหตุจากประจำเดือน โดยใช้ตัวอย่างสมองทดสอบด้วยวิธี Western blot analysis พบว่าการแสดงออกของ 5-HT 1B และ 5-HT 1D receptor ในปมประสาท Trigeminal ไม่ได้รับการควบคุมโดยรอบการเป็นสัด และ 5-HT 1B receptor มีหน้าที่เป็น Autoreceptor (กระตุ้นตัวรับที่ปลายประสาทก่อนเกิดการไซแนปส์) เพื่อควบคุมการหลั่งสารสื่อประสาท Serotonin [103]

Nagata *et al.* (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Serotonin ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยไมเกรน (Cell line) ด้วยวิธี Western blot analysis เพื่อตรวจสอบปริมาณของ Serotonin โดยใช้ Antibody against 5-HT 1B receptor พบว่าระดับของ Serotonin ใน Migraine with aura (MWA) มีปริมาณสูงกว่ากลุ่มเซลล์ควบคุม [6]

Ye *et al.* (2011) ศึกษาผลกระทบของยา Flunarizine (FLN) ซึ่งจัดเป็นยาในกลุ่มที่เป็นตัวต้านแคลเซียม (Calcium antagonists) ใช้เป็นยารักษาอาการปวดไมเกรนและรักษาอาการเวียนศีรษะที่ป้องกันภาวะแคลเซียมในเซลล์สูง โดยศึกษาเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ปิดกั้นการไหลของกระแสไฟฟ้า Na⁺ และ Ca⁺ ในเซลล์ประสาทบริเวณเยื่อหุ้มสมองของหนูทดลองด้วยวิธี Whole-cell patch clamp พบว่ากระแสของ Na⁺ (I_{Na}) และ Ca⁺ (I_{Ca}) ถูกปิดกั้นโดย FLN ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาและมีค่า

ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Half maximal inhibitory concentration ; IC_{50}) เท่ากับ $0.94 \mu M$ และ $1.77 \mu M$ ตามลำดับ [104]

Jennings *et al.* (2004) ศึกษาผลของ Sumatriptan ซึ่งเป็นยารักษาอาการปวดไมเกรนต่อเซลล์ประสาทไขสันหลังส่วน Dorsal horn ของหนูทดลอง โดยใช้วิธี Whole-cell patch clamp เพื่อตรวจสอบการส่งสัญญาณกระแสไฟฟ้าก่อนและหลังรอยประสานประสาท (Pre and Post Synaptic) ระหว่าง Trigeminal primary afferent fibres และเซลล์ประสาทไขสันหลังส่วน Dorsal horn พบว่า Sumatriptan ไม่มีผลต่อ Postsynaptic อย่างมีนัยสำคัญต่อเชื่อมเซลล์ในช่วง 260-2130 mV และจากการทดสอบด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction พบ mRNA ทั้ง 2 ชนิด คือ 5-HT 1D และ 5-HT 1B receptor ในปมประสาท Trigeminal และ Subnucleus caudalis แสดงให้เห็นว่า Sumatriptan ทำหน้าที่ส่งกระแสไฟฟ้าก่อนรอยประสานประสาท (Presynaptic) บริเวณส่วนกลางของ Trigeminal primary afferent fibres เพื่อลดการปล่อยของกลูตาเมต ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะการกดประสาทจากการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนเลือดทำให้มีอาการปวดศีรษะไมเกรน [105]

Liang *et al.* (2013) ศึกษาผลของยา Amitriptyline (AMI) ในการต้าน Tetrodotoxin (มีผลต่อการปิดกั้นของ Voltage-gated Na-channel) โดยศักย์ไฟฟ้ามีผลทำให้โซเดียมแพร่เข้าเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า 1.9 โวลต์ ($Na_v 1.9$) ที่ทำให้เกิดการปวดบริเวณปมประสาท Trigeminal ของหนูทดลอง โดยใช้วิธี Whole-cell patch clamp พบว่า Amitriptyline มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโซเดียมแบบเฉียบพลันในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (Concentration dependent manner) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ $15.16 \mu M$ จากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่า AMI เป็น State-selective blocker ของช่องโซเดียมขณะเกิดความเจ็บปวดบริเวณปมประสาท Trigeminal ของหนูทดลอง ซึ่งก่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษาอาการปวดต่างๆ รวมทั้งไมเกรน [106]

Loyd *et al.* (2012) ศึกษาผลของยาแก้ปวดต่อสาร Serotonin (5-HT) และ Capsaicin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อนในหนูทดลองด้วยวิธี Rat hindpaw thermal assay พบว่าการฉีด Serotonin ขนาดสูงที่สุด ($0.1 \text{ nmol}/\mu l$) เข้าใต้อุ้งเท้าด้านหลัง ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อนได้ดีที่สุดทุกช่วงเวลาและการฉีด Serotonin $0.1 \text{ nmol}/\mu l$ ก่อนฉีด Capsaicin $3 \text{ nmol}/10 \mu l$ 10 นาที พบว่า Serotonin ช่วยเสริมการออกฤทธิ์ของ Capsaicin ส่วนการฉีดยา Sumatriptan ก่อนการฉีด Capsaicin 15 นาที พบว่ายา Sumatriptan $0.01 \text{ nmol}/\mu l$ ช่วยเพิ่มระยะเวลาทนต่อความร้อน (Paw withdrawal latency ; PWL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 10 นาที หลังจากฉีด Capsaicin [107]

Wu *et al.* (2014) ศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรจีนต่อ Serotonin ที่เกี่ยวข้องกับไมเกรนในหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley rat และ Kunming mice โดยการใช้ Reserpine เหนี่ยวนำให้ระดับของ Serotonin ลดลง และศึกษา Blood clotting time พบว่าหนูที่ได้รับสารทดสอบมีระดับของ Serotonin สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าหนูที่ได้รับสารทดสอบ สามารถทำให้เลือดเกิดการแข็งตัวได้ช้ากว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ Reserpine เพียงอย่างเดียว [108]



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1.1.1 Acetone
- 3.1.1.2 Alcohol 70 %
- 3.1.1.3 Diazepam
- 3.1.1.4 Caffeine (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.1.5 Capsaicin (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.1.6 Carrageenan (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.1.7 Reserpine (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.1.8 Wetting compound
- 3.1.1.9 Emla (AstraZeneca, Sweden)
- 3.1.1.10 Ibuprofen (Nurofen[®] 200 mg) (Reckitt Benckiser, ประเทศไทย)
- 3.1.1.11 Acacia (Chemical of Highest Quality, England)
- 3.1.1.12 Sumatriptan (Imigran[™] 100 mg) (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, Poland)
- 3.1.1.13 Serotonin creatinine sulfate monohydrate (Sigma-Aldrich, Switzerland)
- 3.1.1.14 Phenylbutazone (PBZ; Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.1.15 Ethyl phenylpropionate (EPP; Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.1.16 Ethanol absolute for analysis (Merck, Germany)
- 3.1.1.17 Normal saline solution 0.9% (NSS; Klean & Kare, ประเทศไทย)
- 3.1.1.18 Phosphate buffered saline (PBS) Tablets (amresco, USA)
- 3.1.1.19 Sodium chloride (NaCl; Merck KGaA, Germany)
- 3.1.1.20 Potassium chloride (KCl)
- 3.1.1.21 Sodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄)
- 3.1.1.22 Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄; Fisher, UK)

- 3.1.1.23 Sodium hydroxide (NaOH; Ajax, Australia)
- 3.1.1.24 Gel base
- 3.1.1.25 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.1.1.26 Serotonin Research ELISA™ kit (Labor Diagnostika Nord GmbH, Germany)
- 3.1.1.27 Serotonin ELISA^{Fast Track} kit (Labor Diagnostika Nord GmbH, Germany)
- 3.1.1.28 Anti-5HT1B Receptor antibody (Abcam®, England)
- 3.1.1.29 NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel 1.0 mm×10 well (novex®, USA)
- 3.1.1.30 NuPAGE® LDS Sample Buffer (novex®, USA)
- 3.1.1.31 NuPAGE® MES SDS Running Buffer (novex®, USA)
- 3.1.1.32 Seeblue® Plus 2 Prestained Standard (novex®, USA)
- 3.1.1.33 Qubit® Protein Assay Kit (labeling&detection) (molecular probes®, USA)
- 3.1.1.34 Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics GmbH, Germany)
- 3.1.1.35 Secondary (2°) Antibody Solutions Alk-Phos. Conjugated (Anti-Rabbit) (invitrogen™, USA)
- 3.1.1.36 Novex® AP Chromogenic Substrate (BCIP/NBT) (invitrogen™, USA)
- 3.1.1.37 Skim milk (HiMedia Laboratories, India)
- 3.1.1.38 Polysorbate 20 (Tween 20; บริษัท วันรัต (หน้าเขี้ยว) จำกัด, ประเทศไทย)
- 3.1.1.39 pH Singles reference standard 4.01, 7.00 และ 10.00 (NIST, USA)
- 3.1.1.40 Tris
- 3.1.1.41 Trizma® hydrochloride (Tris HCl; Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.1.42 Tris Base (Fisher Scientific, USA)
- 3.1.1.43 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.1.44 Sodium dodecyl sulphate (SDS)
- 3.1.1.45 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 3.1.1.46 Deionized water (บริษัท สิทธิพรแอสโซซิเอต จำกัด, ประเทศไทย)
- 3.1.1.47 น้ำกลั่น (Distilled water)
- 3.1.1.48 น้ำมันกานพลู
- 3.1.1.49 สารสกัดดอกกานพลูจากเอทานอล

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1.2.1 เครื่องกลั่นด้วยน้ำ (Hydro-distillation)
- 3.1.2.2 เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator; IKA[®], Malaysia)
- 3.1.2.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Memmert, Thailand)
- 3.1.2.4 เครื่อง Tail flick meter (Ugo Basile, Italy)
- 3.1.2.5 เครื่อง Plethysmometer (Ugo Basile, Italy)
- 3.1.2.6 เครื่อง Microplate reader (Thermo Scientific, Finland)
- 3.1.2.7 เครื่อง Homogenizer (Art-Micra, Germany)
- 3.1.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge; Beckman Coulter, USA)
- 3.1.2.9 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave; SANYO Electric, Japan)
- 3.1.2.10 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator; WTE binder, Germany)
- 3.1.2.11 เครื่อง Rota rod (T.Science, ประเทศไทย)
- 3.1.2.12 เครื่องชั่งสาร 3 ตำแหน่ง (AND GF, Japan)
- 3.1.2.13 เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง (Sartorius, ประเทศไทย)
- 3.1.2.14 เครื่องชั่งตัดน้ำหนัก (Mettler Toledo, ประเทศไทย)
- 3.1.2.15 เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer; Barnstead Thermolyne Cimarec 2, USA)
- 3.1.2.16 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer; Scientific Industries, ประเทศไทย)
- 3.1.2.17 เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH Tester; Clean Instruments, USA)
- 3.1.2.18 เครื่องเขย่า (Shaker; Heidolph POLYMAX 2040, ประเทศไทย)
- 3.1.2.19 เครื่องเขย่า Microtiter plate (Gibthai, ประเทศไทย)
- 3.1.2.20 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Mini centrifuge; Dragon lab, China)
- 3.1.2.21 Pocket thickness gauge (Mitutoyo, Japan)
- 3.1.2.22 Micropipettes (Biohit, Finland)
- 3.1.2.23 Multichannel micropipettes (Biohit, Finland)
- 3.1.2.24 Micropipette tip (Biohit, Finland)
- 3.1.2.25 Syringe ขนาด 1, 3, 5, 10 และ 20 ml (Nipro, ประเทศไทย)
- 3.1.2.26 เข็มฉีดยาขนาด 21 G×1" (0.8×25 mm), 26 G×1.5" (0.45×12 mm) และ 27 G×1.5" (0.4×12 mm) (Nipro, ประเทศไทย)

- 3.1.2.27 เข็มปีกผีเสื้อ (Scalp Vein) ขนาด 22G×3/4" (0.7×19 mm)
(Nipro, ประเทศไทย)
- 3.1.2.28 เข็มป้อนยาสำหรับสัตว์ทดลอง (Stomach tube; T.Science, ประเทศไทย)
- 3.1.2.29 กระบอกตวง
- 3.1.2.30 บีกเกอร์
- 3.1.2.31 โกร่งบดยา (Mortar and pestle)
- 3.1.2.32 ขวดเตรียมยา
- 3.1.2.33 ฟู่กัน
- 3.1.2.34 Eppendorf (axygen, USA)
- 3.1.2.35 Centrifuge tube (Corning, Mexico)
- 3.1.2.36 Qubit[®] 2.0 Fluorometer (invitrogen[™], Austria)
- 3.1.2.37 Power Supply Adapter Set (novex[®], Germany)
- 3.1.2.38 MS 300 V Power Supply (major science, USA)
- 3.1.2.39 iBlot[™] Gel Transfer Device (invitrogen[™], Israel)
- 3.1.2.40 Qubit[®] assay tubes (molecular probes[®], USA)
- 3.1.2.41 Gel Loading Tips (Round) (novex[®], USA)
- 3.1.2.42 XCell SureLock[™] Mini-Cell (invitrogen[™], USA)
- 3.1.2.43 iBlot[®] Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Regular (novex[®], Israel)

3.2 สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทำวิจัย

3.2.1 สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูขาวเพศผู้ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่

- 3.2.1.1 สายพันธุ์ Wistar rat จำนวนทั้งสิ้น 204 ตัว
- 3.2.1.2 สายพันธุ์ ICR Mouse จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัว

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลู

3.3.1.1 การกลั่นน้ำมันกานพลู

นำดอกกานพลูแห้งไปกลั่นน้ำมันกานพลู โดยใช้เครื่องกลั่นด้วยน้ำ (Hydro-distillation) ณ ศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

3.3.1.2 การสกัดสารจากดอกกานพลู

1) นำดอกกานพลูแห้งบดให้ละเอียด ใส่ถุงผ้าดิบ 500 กรัม เพื่อนำไปหมักในโหลหมักด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:10 (หรืออัตราส่วนระหว่างกานพลู 100 กรัม ต่อเอทานอล 1,000 มิลลิลิตร) หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองเอากากทิ้ง เหลือไว้เฉพาะส่วนใสแล้วทำการกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1)

2) นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 1) มาระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator) ณ ห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี เพื่อให้ได้สารสกัดกานพลูที่มีความเข้มข้นสูง มีลักษณะเหนียวและข้น

3) นำสารที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

การปฏิบัติกับสัตว์ทดลองได้รับการอนุมัติให้ทำการทดลองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยนำหนูทดลองมาพักที่อาคารสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เพื่อคลายความเครียดจากการขนส่งและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพในห้องทดลองก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงและควบคุมอยู่ระหว่าง 25±2 องศาเซลเซียส ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 70 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมไฟเปิดปิดทุก 12 ชั่วโมง วัสดุรองนอนใช้ซังข้าวโพด (Corn cob) ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อโรคแล้ว เพื่อใช้ดูดซับสิ่งปฏิกูล ที่กรงมีช่องสำหรับให้น้ำและอาหารแก่หนูทดลองตลอดเวลา

3.3.3 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดดอกกานพลูในการบรรเทาอาการปวด

3.3.3.1 Tail flick test [109-111]

เป็นการศึกษาฤทธิ์บรรเทาอาการปวด โดยประยุกต์วิธีการของ Correa et al., 1996; Kolesnikov and Pasternak, 1999; Mathes and Kanarek, 2006 ซึ่งใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rat อุดอาหารหนูก่อนทดลองเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

1) น้ำมันกานพลู ใช้หนูทดลองจำนวน 30 ตัว น้ำหนัก 297-371 g โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

- Control ได้รับ Gel base
- Standard drug ได้รับยา Emla 5% w/w
- Treated I ได้รับน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 1% w/w
- Treated II ได้รับน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 5% w/w
- Treated III ได้รับน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 10% w/w

โดยการเตรียมน้ำมันกานพลูสำหรับใช้ทำให้สัตว์ทดลอง จะเตรียมให้อยู่ในรูปของครีมเช่นเดียวกับยามาตรฐาน โดยผสมน้ำมันกานพลูความเข้มข้นต่างๆ ใน Gel base

ส่วนสารสกัดดอกกานพลู ใช้หนูทดลองจำนวน 30 ตัว น้ำหนัก 179-216 g โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

- Control ได้รับสารละลาย Acacia 5% w/v
- Standard drug ได้รับยา Ibuprofen 100 mg/kg/body weight (bw)
- Treated I ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 250 mg/kg/bw
- Treated II ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw
- Treated III ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw

โดยการเตรียมายามาตรฐานและสารสกัดดอกกานพลูสำหรับป้อนให้สัตว์ทดลอง เตรียมโดยละลายในสารละลาย Acacia 5% w/v

2) วัด Baseline latency ของความทนต่อความร้อนก่อนให้สารทดสอบด้วยเครื่อง Tail flick meter โดยนำหางหนูวางอยู่บนแผ่นรวมแสง ให้ส่วนของหางหนูจากด้านปลายหางประมาณ 3 เซนติเมตร วางปิดจุดรวมแสงซึ่งมีการตั้งค่าความเข้มแสง (Intensity) ที่ 50 และมีการจำกัดเวลาของความทนต่อความร้อน (Cut off time) ที่ 10 วินาที เพื่อเป็นการป้องกันเซลล์บริเวณหางหนูถูกทำลายจากความร้อน จับเวลาเพื่อดูการยกหางหนีจากความร้อนของหนูแต่ละตัว ทำการวัด 3 ครั้ง/ตัว แล้วหาค่าเฉลี่ย

3) ให้สารทดสอบกับหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม ดังนี้

- น้ำมันกานพลู ให้โดยการทาสารทดสอบ 0.5 กรัม ให้ทั่วบริเวณจากปลายหาง 3 เซนติเมตร จุดเดียวกับที่วัด Baseline latency และนวดเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ยาซึมเข้าไปในผิวหนัง

- สารสกัดกานพลู ให้โดยการป้อนทางหลอดอาหาร (Oral gavage administration)

4) วัดระยะเวลาทนต่อความร้อนหลังจากให้สารทดสอบที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 180 และ 240 นาที บันทึกเวลาที่หนูยกหางทุกช่วงเวลาเพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพสูงสุดที่คาดว่าจะเป็นไปได้ (% Maximal possible effect ; MPE) จากสูตร

$$\% \text{ MPE} = [(\text{Test latency} - \text{Baseline latency}) / (\text{Cut off time} - \text{Baseline latency})] \times 100$$



3.3.3.2 Hot plate test [107]

เป็นการศึกษาฤทธิ์บรรเทาอาการปวด โดยประยุกต์วิธีการของ Loyd et al., 2012 ใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rat อุดอาหารหนูก่อนทดลองเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองนี้จะแบ่งออกเป็น 2 แผนการทดลอง ได้แก่ Serotonin-evoked thermal hyperalgesia และ Capsaicin-evoked thermal hyperalgesia

1) Serotonin-evoked thermal hyperalgesia เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกกานพลูต่อ Serotonin ที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน โดยใช้หนูทดลองจำนวน 30 ตัว น้ำหนัก 224-288 g ซึ่งมีขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

(1) ตั้งอุณหภูมิ Water bath ที่ 56.5 ± 0.5 องศาเซลเซียส โดยใช้บีกเกอร์ขนาด 5 ลิตร ลงใน Water bath เพื่อใช้เป็นอุปกรณ์ใส่หนูทดลองและมีการจำกัดเวลาของความทนต่อความร้อน (Cut off time) ที่ 40 วินาที เพื่อป้องกันเซลล์บริเวณอุ้งเท้าหนูถูกทำลายจากความร้อน

(2) แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

- Control ได้รับสารละลาย Acacia 5% w/v
- Standard drug ได้รับยา Sumatriptan 100 mg/kg/bw
- Treated I ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 250 mg/kg/bw
- Treated II ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw
- Treated III ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw

โดยการเตรียมมาตรฐานและสารสกัดดอกกานพลูสำหรับป้อนให้สัตว์ทดลอง เตรียมโดยละลายในสารละลาย Acacia 5% w/v

(3) วัด Baseline latency ของการทนต่อความร้อนก่อนจะให้สารทดสอบ โดยนำหนูใส่ลงในบีกเกอร์ โดยทำสัญลักษณ์ที่หลังเท้าข้างที่ทำการทดสอบ จับเวลาหลังจากที่เท้าหลังของหนูทั้งสองข้างเหยียบลงบนบีกเกอร์และสังเกตการยกเท้าหลังข้างที่ทำสัญลักษณ์ จดบันทึกเวลาและคัดเลือกหนูที่ทนความร้อนในช่วง 15-25 วินาที เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง จากนั้นให้สารทดสอบโดยวิธีการป้อนทางหลอดอาหาร (Oral gavage administration)

(4) หลังจากให้สารทดสอบ 30 นาที ฉีด Serotonin (5-HT) 0.1 nmol/ μ l เข้าใต้อุ้งเท้า (Intraplantar ; ipl) บริเวณอุ้งเท้าด้านหลังของหนูทดลอง (Rat hindpaw) ของเท้าข้างที่ทำสัญลักษณ์ไว้ และวัดระยะเวลาทนต่อความร้อน (Paw withdrawal latency ; PWL) ที่เวลา 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที บันทึกผลการทดลองและคำนวณหา %MPE

(5) เก็บตัวอย่างเลือดของหนูทุกตัว โดยดูดจากหลอดเลือดบริเวณหาง (Tail vein) ด้วยเข็มปีกผีเสื้อ (Scalp vein) ขนาด 22 G ใส่ Eppendorf ประมาณ 1 ml เพื่อนำไปวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ด้วยวิธี ELISA ในขั้นต่อไป

2) Capsaicin-evoked thermal hyperalgesia เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกกานพลูต่อ Capsaicin ที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน โดยใช้หนูทดลองจำนวน 18 ตัว น้ำหนัก 286-390 g ซึ่งโดยมีขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

(1) ตั้งอุณหภูมิ Water bath ที่ 56.5 ± 0.5 องศาเซลเซียส โดยใส่ปีกเกอร์ขนาด 5 ลิตร ลงใน Water bath เพื่อใช้เป็นอุปกรณ์ใส่หนูทดลอง และจำกัดเวลาของความทนต่อความร้อน (Cut off time) ที่ 40 วินาที เพื่อป้องกันการถูกทำลายของเซลล์บริเวณอุ้งเท้าหนู

(2) แบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 3 ตัว ดังนี้

- Control ได้รับความละลาย Acacia 5% w/v
- Standard drug I ได้รับความยา Sumatriptan 100 mg/kg/bw
- Standard drug II ได้รับความยา Ibuprofen 100 mg/kg/bw
- Treated I ได้รับความสกัดดอกกานพลูขนาด 250 mg/kg/bw
- Treated II ได้รับความสกัดดอกกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw
- Treated III ได้รับความสกัดดอกกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw

โดยการเตรียมมาตรฐานและสารสกัดดอกกานพลูสำหรับป้อนให้สัตว์ทดลอง เตรียมโดยละลายในสารละลาย Acacia 5% w/v

(3) วัด Baseline latency ของการทนต่อความร้อนก่อนจะให้สารทดสอบ โดยนำหนูใส่ลงในปีกเกอร์ โดยทำสัญลักษณ์ที่หลังเท้าข้างที่ทำการทดสอบ จับเวลาหลังจากที่เท้าหลังของหนูทั้งสองข้างเหยียบลงบนปีกเกอร์และสังเกตการยกเท้าหลังข้างที่ทำสัญลักษณ์ จดบันทึกเวลาและคัดเลือกหนูที่ทนความร้อนในช่วง 15-25 วินาที เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง จากนั้นให้สารทดสอบโดยวิธีการป้อนทางหลอดอาหาร (Oral gavage administration)

(4) หลังจากให้สารทดสอบ 30 นาที ฉีด Capsaicin 3 nmol/50 μ l เข้าใ้ อุ้งเท้า (Intraplantar ; ipl) บริเวณอุ้งเท้าหลังของหนู (Rat hindpaw) ข้างที่ทำสัญลักษณ์ไว้ และวัดระยะเวลาทนต่อความร้อน (Paw withdrawal latency ; PWL) ที่เวลา 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที บันทึกผลการทดลอง จากนั้นนำค่าการทนต่อความร้อนที่บันทึกในแต่ละช่วงเวลามาคำนวณหา %MPE

3.3.4 ศึกษาฤทธิ์ต่อการนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อในสัตว์ทดลอง [112-114] เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อระยะเวลาการนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อของสัตว์ทดลอง โดยประยุกต์วิธีการของ Zia et al., 1995; Tsuji et al., 1996; Helton et al., 1998 ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

3.3.4.1 ศึกษาฤทธิ์ในการนอนหลับด้วยวิธี Sleeping time

ใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ ICR Mouse จำนวน 30 ตัว น้ำหนัก 37-46 g โดยอดอาหารหนูก่อนทดลอง 16 ชั่วโมง

1) แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

- Control ได้รับสารละลาย Acacia 5% w/v
- Standard drug ได้รับ Caffeine 20 mg/kg/bw
- Treated I ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 250 mg/kg/bw
- Treated II ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw
- Treated III ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw

โดยการเตรียมมาตรฐานและสารสกัดดอกกานพลูสำหรับป้อนให้สัตว์ทดลอง เตรียมโดยละลายในสารละลาย Acacia 5% w/v

2) ให้สารทดสอบกับหนูทดลองทุกกลุ่ม โดยวิธีการป้อนทางหลอดอาหาร (Oral gavage administration)

3) หลังจากป้อนสารทดสอบ 60 นาที ป้อน Diazepam ขนาด 10 mg/kg/bw ให้ หนูทดลองทุกตัว เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการหลับ

4) สังเกตการหลับทันทีด้วยการทดสอบ Righting reflex โดยการกระตุ้นบริเวณหูและอุ้งเท้าด้วยพู่กัน หากไม่มีการเคลื่อนไหวหรือไม่มีการกระตุกรับเรียกได้ว่าเป็นการหลับสนิท แต่ถ้ายังมีปฏิกิริยาตอบรับต้องรอสังเกตจนไม่มีปฏิกิริยาตอบรับจึงบันทึกช่วงเวลาของการหลับได้แก่

- Onset คือ เวลาตั้งแต่ป้อน Diazepam ถึงสูญเสีย Reflex (เริ่มหลับ)
- Duration time คือ เวลาเริ่มหลับถึงตื่น

5) นำช่วงเวลาที่บันทึกได้ไปหาค่าเฉลี่ยของ Onset และ Duration time ของสารทดสอบในแต่ละกลุ่ม

3.3.4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อด้วยวิธี Muscle relaxant activity

โดยการศึกษาความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อจะใช้ทดสอบร่วมกับวิธี Sleeping time ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

1) ใช้หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ ICR Mouse จำนวน 30 ตัว น้ำหนัก 35-47 g ก่อนการทดลองฝึกหนูเพื่อให้หนูทุกตัวสามารถเดินบนเครื่อง Rota rod ได้ที่ความเร็วรอบ 20 รอบ/นาที่ (rpm) เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการฝึกเป็นเวลาประมาณ 2 เดือน บันทึกเวลาเป็นหน่วยวินาทีที่หนูตกจาก Rota rod พร้อมทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักทุกสัปดาห์ ก่อนทดลองอดอาหารหนูเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2) แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

- Control ได้รับสารละลาย Acacia 5% w/v
- Standard drug ได้รับ Caffeine 20 mg/kg/bw
- Treated I ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 250 mg/kg/bw
- Treated II ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw
- Treated III ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw

โดยการเตรียมยามาตรฐานและสารสกัดดอกกานพลูสำหรับป้อนให้สัตว์ทดลอง เตรียมโดยละลายในสารละลาย Acacia 5% w/v

3) ให้สารทดสอบกับหนูทดลองทุกกลุ่ม โดยวิธีการป้อนทางหลอดอาหาร (Oral gavage administration)

4) หลังจากป้อนสารทดสอบ 60 นาที ป้อนยา Diazepam ขนาด 10 mg/kg/bw ให้หนูทดลองทุกตัว

5) หลังจากป้อนยา Diazepam เป็นเวลา 30 นาที นำหนูทดลองทุกตัวเดินบนเครื่อง Rota rod ความเร็ว 20 rpm เป็นเวลา 180 วินาที จากนั้นบันทึกวินาทีที่หนูตกจาก Rota rod

3.3.5 ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

3.3.5.1 EPP-induced rat ear edema [115]

เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยประยุกต์วิธีการของ Dunstan et al., 1997 ใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rat จำนวน 30 ตัว น้ำหนัก 156-198 g อุดอาหารหนูก่อนทดลองเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

1) แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

- Control ได้รับ Acetone
- Standard drug ได้รับ Phenylbutazone 5% w/v
- Treated I ได้รับน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 1% v/v
- Treated II ได้รับน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 7.5% v/v
- Treated III ได้รับน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 15% v/v

2) วัดความหนาของใบหูหนูก่อนทดลองด้วยเครื่อง Pocket thickness gauge

3) ให้สารทดสอบโดยการทาสารทดสอบลงบนใบหูหนูทั้งด้านในและด้าน

นอกด้านละ 10 μ l ปริมาตร 20 μ l/หู หลังจากให้สารทดสอบ 30 นาที เหนียวน้ำให้ใบหูเกิดการระคายเคืองและอักเสบ โดยการทา Ethyl phenylpropiolate (EPP) 5% v/v บริเวณเดียวกับที่ทาสารทดสอบ จากนั้นวัดความหนาของใบหูที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที บันทึกความหนาของหู (Ear thickness) ในแต่ละช่วงเวลา และคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการอักเสบ จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(Control - Treated) / (Control)] \times 100$$

3.3.5.2 Rat paw edema [116]

เป็นการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยประยุกต์วิธีการของ Fregnan and Torsello, 1995 ใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rat จำนวน 30 ตัว น้ำหนัก 169-188 g อดอาหารหนู ก่อนทดลองเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

1) แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

- Control ได้รับสารละลาย Acacia 5% w/v
- Standard drug ได้รับ Phenylbutazone 250 mg/kg/bw
- Treated I ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 250 mg/kg/bw
- Treated II ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw
- Treated III ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw

โดยการเตรียมมาตรฐานและสารสกัดดอกกานพลูสำหรับป้อนให้สัตว์ทดลอง เตรียมโดยละลายในสารละลาย Acacia 5% w/v

2) วัดปริมาตรอุ้งเท้าหนู (Paw volume) ก่อนทดสอบ 1 ครั้ง/ตัว ด้วยเครื่อง Plethysmometer

3) ให้สารทดสอบกับหนูทดลองทุกกลุ่ม โดยวิธีการป้อนทางหลอดอาหาร (Oral gavage administration)

4) หลังจากป้อนสารทดสอบ 1 ชั่วโมง ฉีด Carrageenan 1% w/v (0.1 ml) เข้าที่บริเวณอุ้งเท้าด้านหลัง (Intraplantar; ipl) ของหนูทุกตัว เพื่อเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าหนูเกิดการอักเสบ

5) วัดปริมาตรของอุ้งเท้าหนูหลังจากที่ฉีด Carrageenan ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกปริมาตรของอุ้งเท้าหนูเพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการอักเสบ

3.3.6 Reserpine-induced low serotonin levels test [108,117]

เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อ Reserpine ที่เหนี่ยวนำให้ระดับของ Serotonin ลดลง โดยประยุกต์วิธีการของ Muck-Seler and Diksic, 1995; Wu et al., 2014 ใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rat จำนวน 36 ตัว น้ำหนัก 408-511 g อดอาหารหนูก่อนทดลองเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งมีขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

3.3.6.1 แบ่งหนุออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

- Sham กลุ่มหนูปกติที่ไม่ได้รับสารทดสอบ
- Control ได้รับสารละลาย Acacia 5% w/v
- Standard drug ได้รับยา Sumatriptan 50 mg/kg/bw
- Treated I ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 250 mg/kg/bw
- Treated II ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw
- Treated III ได้รับสารสกัดดอกกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw

โดยการเตรียมยามาตรฐานและสารสกัดดอกกานพลูสำหรับป้อนให้สัตว์ทดลอง เตรียมโดยละลายในสารละลาย Acacia 5% w/v

3.3.6.2 ทำการทดลองเป็นเวลา 9 วัน โดยฉีด Reserpine 0.25 mg/kg/bw เข้าที่ช่องท้อง (Intraperitoneal injection, i.p.) ให้กับหนูทดลองทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่ม Sham จะฉีด Normal saline solution (NSS)

3.3.6.3 วันที่ 3-9 ของการทดสอบ ให้สารทดสอบให้กับหนูทุกกลุ่ม โดยวิธีการป้อนทางหลอดอาหาร (Oral gavage administration) ยกเว้นกลุ่ม Sham หลังจากป้อนสารทดสอบ 30 นาที ฉีด Reserpine ตามปกติ

3.3.6.4 วันสุดท้ายของการทดสอบ หลังจากฉีด Reserpine เป็นเวลา 30 นาที เก็บสมองของหนูทดลองทุกตัว ล้างให้สะอาดด้วยน้ำเกลือ 0.9% ที่เย็น จากนั้นชั่งน้ำหนักสมองลงใน Tube สำหรับเก็บสมอง โดยเติม Phosphate buffer saline (PBS) ที่แช่เย็นในอัตราส่วนน้ำหนักสมอง 1g : PBS buffer 9 ml

3.3.6.5 นำตัวอย่างสมองเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ในขั้นตอนต่อไป

3.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3.3.7.1 Serum

ในการวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ใน Serum ของสัตว์ทดลองจะใช้ Serotonin ELISA^{Fast Track} kits (BA E-8900 ; Labor Diagnostika Nord GmbH, Germany) โดยนำ Reagent และตัวอย่างทั้งหมดในรูปของ Supernatant ซึ่งเก็บอยู่ในรูปของ Aliquots ที่ต้องการวิเคราะห์ออกมาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยแต่ละตัวอย่างควรทำการวัด 2 ซ้ำ มีขั้นตอนของการวิเคราะห์ดังนี้

1) การเตรียมตัวอย่าง Serum

โดยนำตัวอย่าง Serum ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ออกมาละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2) การเตรียม Reagents

(1) Wash buffer โดยใช้ Wash Buffer Concentrate 20 ml เจือจางในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1000 ml สามารถเก็บได้ไม่เกิน 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 2-8 °C

(2) Acylation Reagent อยู่ในรูปพร้อมใช้ สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 °C)

3) การเตรียมตัวอย่างและ Acylation ของ Serum

(1) ใช้ Micropipette คูด Standards 25 µl, Control 25 µl และ Serum 25 µl ลงใน Reaction Tubes ของแต่ละตัวอย่าง ตามที่วางแผนไว้

(2) เติม Acylation Buffer 500 µl ลงทุกหลอด

(3) เติม Acylation Reagent 25 µl ลงทุกหลอด

(4) ผสมสารละลายให้เข้ากันและ Incubate 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 °C)

4) Serotonin ELISA

(1) คูด Acylated Standards, Controls และตัวอย่าง Serum ปริมาตร 25 µl จาก Reaction Tubes ลงในหลุมของ Serotonin Microtiter Strips ตามที่วางแผนไว้

(2) เติม Serotonin Antiserum 100 µl ลงในทุกหลุม

(3) Incubate 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 °C) บน Shaker (600 rpm)

(4) เทสารละลายที่อยู่ใน Plate ทิ้ง และล้างแต่ละหลุมด้วย Wash buffer 300 µl 3 ครั้ง จากนั้นทำให้แต่ละหลุมแห้งโดยการคว่ำ Plate ลงบนวัสดุดูดซับ

- (5) เติม Conjugate 100 μ l ลงในทุกหลุม
- (6) Incubate 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) บน Shaker (600 rpm)
- (7) ทำซ้ำตามข้อ (4)
- (8) เติม Substrate 100 μ l ลงในทุกหลุม
- (9) Incubate 15 \pm 2 นาที อุณหภูมิห้อง (20-25°C) บน Shaker (600 rpm)

หลีกเลี่ยงการโดนแสง

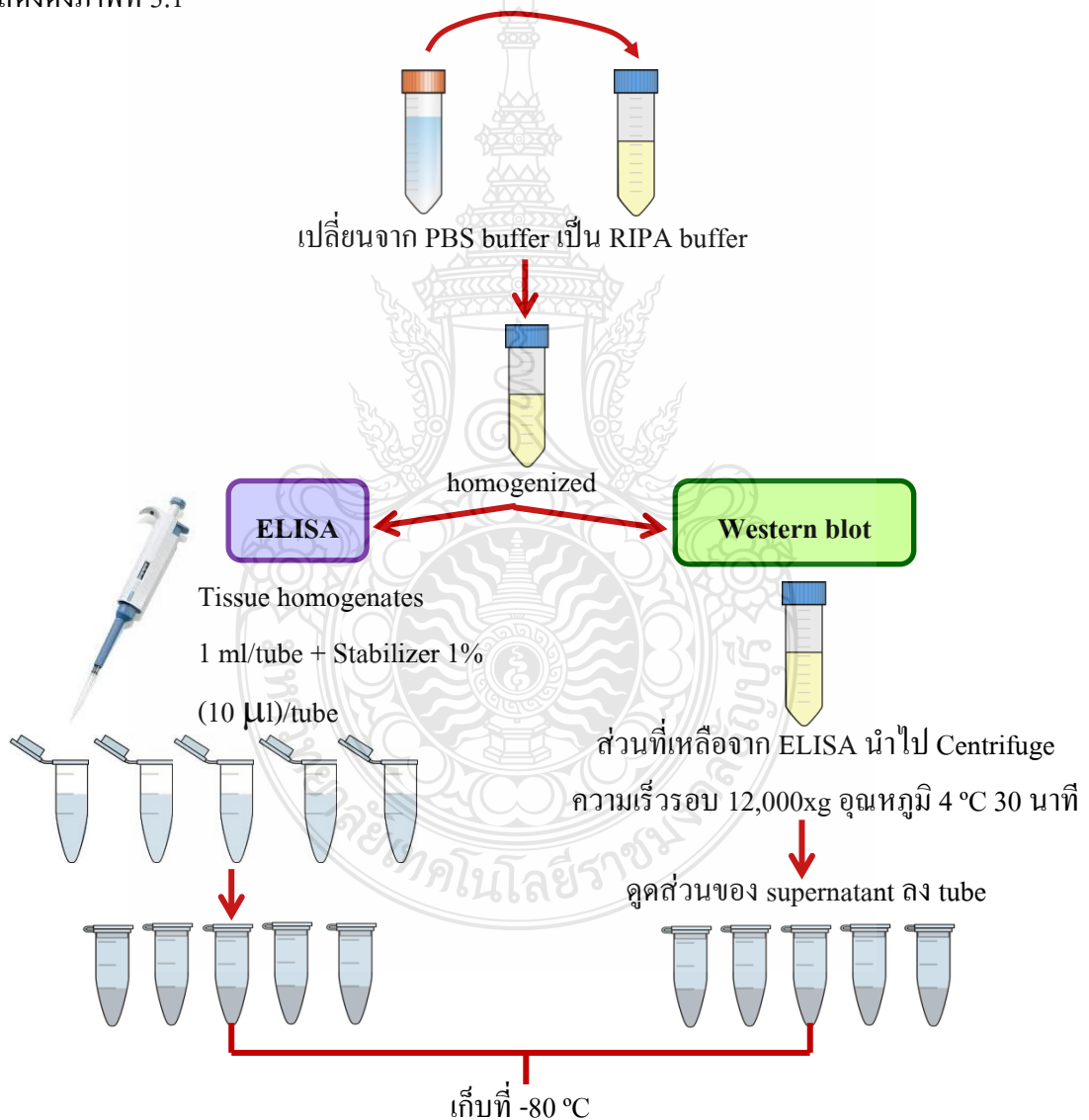
- (10) เติม Stop solution 100 μ l ลงในทุกหลุม และเขย่า Microtiter plate ประมาณ 1 นาที เพื่อให้สารผสมกันได้ดี
- (11) อ่านค่าการดูดกลืนแสงภายใน 10 นาที โดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm



3.3.7.2 สมอ

ในการวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ในสมองของสัตว์ทดลองจะใช้ Serotonin Research ELISA (BA E-5900 ; Labor Diagnostika Nord GmbH, Germany) โดยนำ Reagent และตัวอย่างทั้งหมดในรูปของ Tissue homogenates ที่ต้องการวิเคราะห์ออกมาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งแต่ละตัวอย่างควรทำการวัด 2 ซ้ำ มีขั้นตอนของการวิเคราะห์ดังนี้

1) การเตรียมตัวอย่างสมอง โดยประยุกต์วิธีการของ Berman et al., 2006 เพื่อนำไปวิเคราะห์ระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ด้วยเทคนิค ELISA และ Western blotting แสดงดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสมอง [103]

จากภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสมอง เพื่อนำไปใช้สำหรับการทำ ELISA และ Western blotting ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

(1) นำตัวอย่างสมองออกมาละลาย เมื่อตัวอย่างละลายเท Phosphate Buffer Saline (PBS buffer) ที่จกนั้นเติม Radio Immuno Precipitation Assay Buffer (RIPA buffer) ที่มีส่วนประกอบของ Protease inhibitor เพื่อป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Protease enzyme) ในปริมาณเดียวกับที่เติม PBS buffer

(2) นำตัวอย่างไป Homogenize ด้วยเครื่อง Homogenizer (Art-Micra, Germany) เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่อยู่ในรูปของ Tissue homogenates โดยระหว่างการ Homogenize นำหลอดตัวอย่างวางลงในน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิของตัวอย่างให้เย็นตลอดเวลา

(3) ส่วนของ ELISA ใช้ Micropipette คูด Tissue homogenates 1 ml ใส่ Eppendorf จำนวน 5 หลอด ต่อ 1 ตัวอย่าง จากนั้นเติม Stabilizer 1% (10 μ l) ลงทุกหลอด เพื่อป้องกันการถูกย่อยสลายของ Serotonin

(4) ส่วนของ Western blot นำ Tissue homogenates ส่วนที่เหลือไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12000xg อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคูดส่วนของ Supernatant เก็บใส่ Eppendorf

(5) นำตัวอย่างที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

2) การเตรียม Reagents

(1) Diluent เตรียมโดยใช้ Dilution Concentrate 50 ml เจือจางในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1000 ml สามารถเก็บได้ไม่เกิน 12 เดือน ที่อุณหภูมิ 2-8 °C

(2) Wash Buffer โดยใช้ Wash Buffer Concentrate 20 ml เจือจางในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1000 ml สามารถเก็บได้ไม่เกิน 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 2-8 °C

(3) Standards และ Controls เจือจาง Standards และ Controls 10 μ l ด้วย Diluent หรือ Buffer 10 ml และเติม Stabilizer 1% (100 μ l)

3) Acylation

(1) นำ Plastic bars ที่ปิด Acylation Plate ออก แล้วใช้ Micropipette คูด Diluted standards 100 μ l, Diluted controls 100 μ l และ tissue homogenates 1-100 μ l ลงใน Acylation Plate ของแต่ละตัวอย่างตามที่วางแผนไว้

(2) เติม Diluent หรือ Buffer ลงในหลุมของตัวอย่าง เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 μ l

- (3) เติม Acylation Buffer 25 μ l ลงในทุกหลุม
- (4) Acylate เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 °C) บน Shaker (600 rpm)

4) Serotonin ELISA

- (1) คูด Acylated standards, controls และตัวอย่าง 100 μ l จาก Acylation Plate ลงในหลุมของ Serotonin/5-HIAA Microtiter Strips ตามที่วางแผนไว้
- (2) เติม Serotonin Antiserum 100 μ l ลงในทุกหลุม
- (3) ปิด plate ด้วย Adhesive Foil และนำไป Incubate เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 2-8 °C
- (4) นำ Adhesive Foil ออก จากนั้นเทสารใน Plate ทิ้งและล้างด้วย Wash buffer หลุมละ 300 μ l จำนวน 3 ครั้ง และทำให้แต่ละหลุมแห้งโดยการคว่ำ Plate ลงบนวัสดุดูดซับ
- (5) เติม Enzyme Conjugate 100 μ l ลงในทุกหลุม
- (6) Incubate ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 °C) บน Shaker (600 rpm) เป็นเวลา 30 นาที
- (7) นำ Adhesive Foil ออก จากนั้นเทสารใน Plate ทิ้งและล้างด้วย Wash buffer หลุมละ 300 μ l จำนวน 3 ครั้ง และทำให้แต่ละหลุมแห้งโดยการคว่ำ Plate ลงบนวัสดุดูดซับ
- (8) เติม Substrate 100 μ l ลงในทุกหลุม นำไป Incubate เป็นเวลา 20-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 °C) บน Shaker (600 rpm) และหลีกเลี่ยงการ โดยแสง
- (9) เติม Stop solution 100 μ l ลงในแต่ละหลุม และเขย่า Plate จนสารเข้ากันได้ดี
- (10) อ่านค่าการดูดกลืนแสงภายใน 10 นาที โดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.3.8 Western blotting technique [118]

โดยประยุกต์วิธีการของ Berman et al., 2006; Harriott and Gold, 2008 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.3.8.1 การสกัดโปรตีน โดยทำการปั่นตัวอย่างสมองด้วยเครื่อง Homogenizer ใน Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) buffer ที่เติม Protease inhibitors เพื่อป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Protease enzyme) ที่มีอยู่ในเซลล์ จากนั้นทำให้เนื้อเยื่อสลายโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้ได้ส่วนของโปรตีน

3.3.8.2 คูดโปรตีนปริมาตร 15 µl ผสมกับ LDS Sample buffer 4X โดยใช้ Sample 3 µl : LDS 1 µl ตัวอย่างเช่น

ถ้า Sample 15 µl ต้องเติม LDS 1 µl

Sample ที่ใช้ 4 µl ต้องเติม LDS = $15/3 = 5$ µl

ดังนั้นในการโหลด Sample จะใช้ปริมาตรทั้งหมด = Sample 15 µl + LDS Sample buffer 5 µl = 20 µl

3.3.8.3 นำตัวอย่างที่ผสมกับ LDS เรียบร้อยแล้ว ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องหรือให้น้ำไหลผ่าน เนื่องจากตัวอย่างที่จะนำไปโหลดถ้าอยู่ในสภาพร้อนจะทำให้เกิดการเสียหายได้

3.3.8.4 Gel Electrophoresis มีขั้นตอนดังนี้

- 1) ลอกแผ่นสติ๊กเกอร์สีขาวออกและดึง comb ออกจาก NuPAGE Novex Bis-Tris gel จากนั้นประกอบเข้ากับเครื่อง XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis
- 2) เท 1X MES buffer ลงใน inner และ outer chamber โดยเทให้ท่วมเส้นลวด
- 3) ก่อนโหลดนำ Sample ไป Spin down
- 4) หยอดโปรตีนตัวอย่างตามปริมาตรที่ได้คำนวณไว้ และ Protein Markers (Seeblue® Plus 2 Prestained Standard) 10 µl ที่เตรียมไว้ลงในหลุมเจลตามที่วางแผนไว้
- 5) ปิดฝาเครื่องและเสียบสายนำไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Power supply
- 6) ทำการแยกโปรตีนที่ 160-200 Volt อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 7) เมื่อครบเวลา ปิดเครื่อง Power supply แล้วนำแผ่นเจลออกจากเครื่อง



ภาพที่ 3.2 Gel electrophoresis

3.3.8.5 ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นและนำไปทำการย้ายโปรตีนลงแผ่น Membrane

3.3.8.6 ย้ายโปรตีนลงแผ่น membrane โดย iBlot Dry Transfer System ดังภาพที่ 3.3





เปิดฝา iBlot Gel Transfer Device



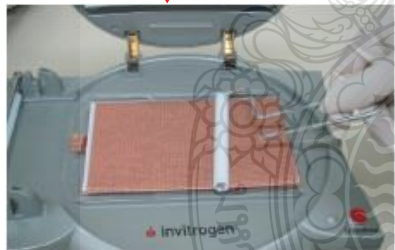
วาง Bottom stack ซึ่งมีแผ่น membrane ลงบนตัวเครื่อง โดยไม่ต้องนำพลาสติกออก



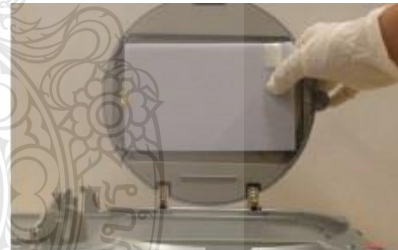
นำกระดาษกรองแช่น้ำกลั่น วางลงบนแผ่นเจล และไล่ฟองอากาศออกให้หมดโดยใช้ Roller



วางแผ่นเจลที่แยกโปรตีนเรียบร้อยแล้วลงบน Bottom stack



วาง Top stack ลงบนกระดาษกรองและ ไล่ฟองอากาศ ออกให้หมด

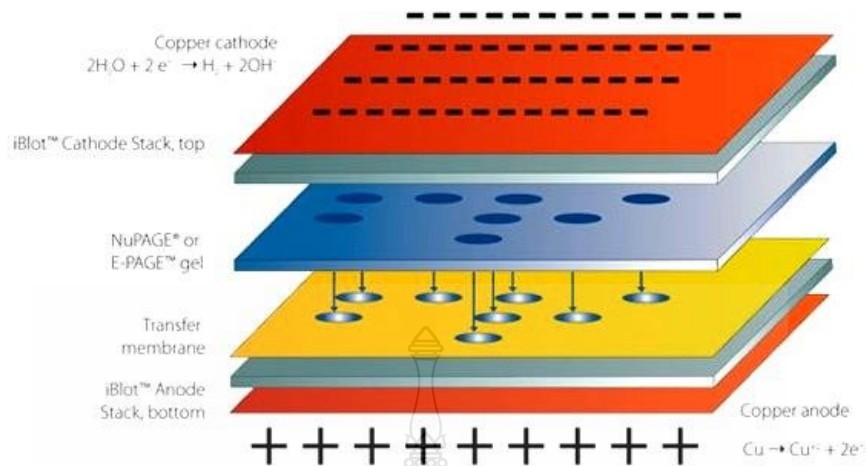


เติมน้ำที่ด้านบนของตัวเครื่อง



ปิดฝาเครื่องให้แน่น แล้วทำการย้ายโปรตีนลงแผ่น membrane ด้วยโปรแกรม P3 ใช้เวลา 7 นาที และกดปุ่ม Start

ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการย้ายโปรตีนลงแผ่น Membrane โดยใช้ iBlot Dry Transfer System [119]



ภาพที่ 3.4 หลักการ Transfer โปรตีนสู่แผ่น Membrane [120]

3.3.8.7 เมื่อเครื่องทำงานเสร็จ ทำการปิดเครื่องแล้วนำแผ่น Membrane ที่มีโปรตีน เรียบร้อยแล้วออก เพื่อนำไปทำขั้นตอน Protein detection ต่อไป

3.3.8.8 Blocking โดยนำแผ่น Membrane ใส่ในกล่อง และเติม Blocking solution (Skim milk 5% w/v ใน Washing buffer) ประมาณ 15-20 ml (ให้ท่วม Membrane) เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการ Blocking

3.3.8.9 เท Skim milk ที่จืดเติม Washing buffer ล้าง 1 นาที และเททิ้ง

3.3.8.10 ล้างด้วย Washing buffer 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที (เขย่า) จากนั้นเท Washing buffer ที่จืด

3.3.8.11 เตรียม Primary antibody (Anti-5HT1B receptor antibody) 2 $\mu\text{g/ml}$ หรือ 2:1000 จาก Stock ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (500 $\mu\text{g/ml}$) โดยเตรียมใน Washing buffer จากนั้นเติม Primary antibody ให้ท่วม membrane เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.8.12 ล้างด้วย Washing buffer 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที (เขย่า) จากนั้นเท Washing buffer ที่จืด

3.3.8.13 เติม Secondary antibody (2° Antibody solutions Alk-Phos. Conjugated) โดยเขย่าขวดและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้ จากนั้นเติมให้ท่วม Membrane เขย่าเป็นเวลา 50 นาที (ห้ามเกิน 1 ชั่วโมง) โดยก่อน ใช้น้ำ Secondary antibody เขย่าขวดและแบ่งส่วนที่จะใช้ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.8.14 เท Secondary antibody ที่จืด และเติม Washing buffer 1 นาที เขย่าและเททิ้ง

3.3.8.15 ล้างด้วย Washing buffer 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที (เขย่า) จากนั้นเท Washing buffer ที่จืด

3.3.8.16 เติม Equilibration buffer ให้ท่วม Membrane และเขย่าเป็นเวลา 5 นาที และเททิ้ง

3.3.8.17 เตรียม Substrate โดย dilute ด้วย Equilibration buffer ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นเทให้ท่วม Membrane นำไปเขย่า และรอ Band ขึ้น (ใช้เวลาประมาณ 5 นาที)

3.3.8.18 Stop reaction ด้วย Deionized water

3.4 วิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่ได้รับน้ำมัน และสารสกัดจากดอกทานตะวันที่มีความเข้มข้นและขนาดต่างๆ โดยนำข้อมูลที่ได้อ้างอิงมาวิเคราะห์และหาค่าทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance ; One-way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยใช้วิธี Tukey's post hoc test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

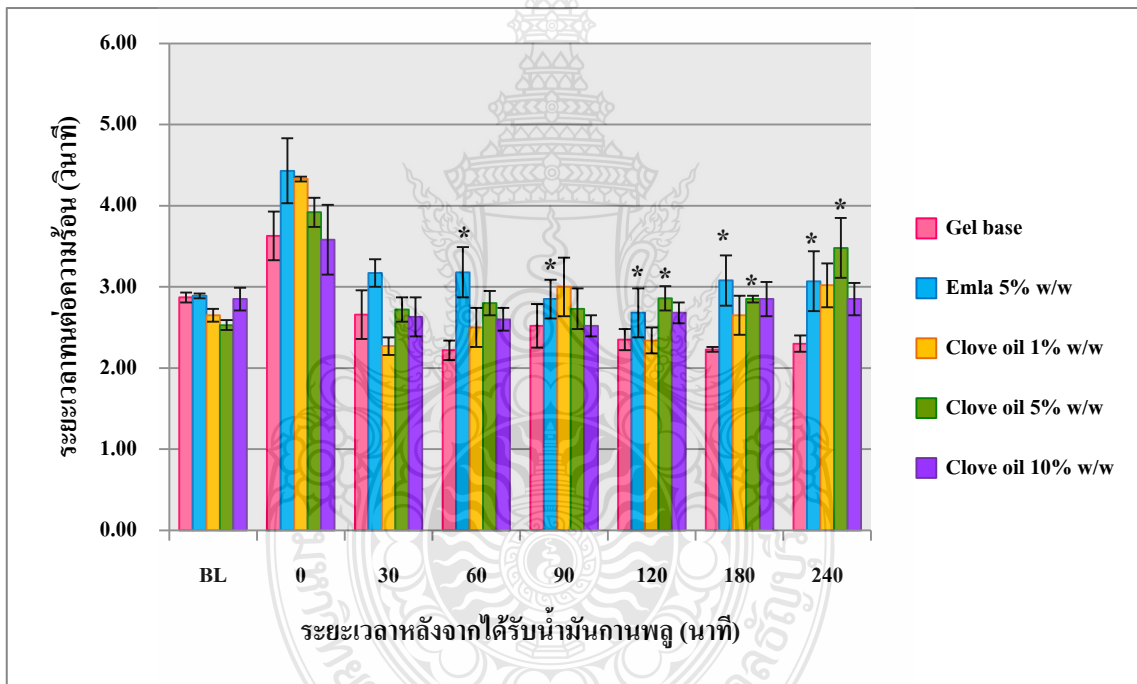
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลของน้ำมันและสารสกัดกานพลูในการบรรเทาอาการปวด

4.1.1 Tail flick test

จากการศึกษาฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดของน้ำมันกานพลู (Clove oil) ด้วยวิธี Tail flick test แสดงผลของระยะเวลาทนต่อความร้อนจากการยกหางหนีจากร้อนของหนูทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ฤทธิ์บรรเทาอาการปวดของน้ำมันกานพลูด้วยวิธี Tail flick test

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

ผลการทดลองพบว่าน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 5% w/w ที่ผสมใน Gel base ออกฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันกานพลูความเข้มข้นอื่น โดยมีระยะเวลาทนต่อความร้อนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 120, 180 และ 240 นาที เช่นเดียวกับขามาตรฐาน Emla ความเข้มข้น 5% w/w ที่มีระยะเวลาทนต่อความร้อนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 60-240 นาที

น้ำมันกานพลู 5% w/w สามารถเพิ่มระยะเวลาการทนต่อความร้อนหลังจากที่ทำน้ำมันกานพลูที่ระยะเวลาต่างๆ โดยน้ำมันกานพลู 1% w/w ไม่สามารถเพิ่มระยะเวลาทนต่อความเจ็บปวดได้อาจเกิดจากความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่น้อยไป จึงทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ ส่วนน้ำมันกานพลู 10% w/w ก็ไม่สามารถบรรเทาอาการปวดได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากกานพลูมีฤทธิ์แสบร้อนเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เพิ่มการระคายเคืองมากขึ้น

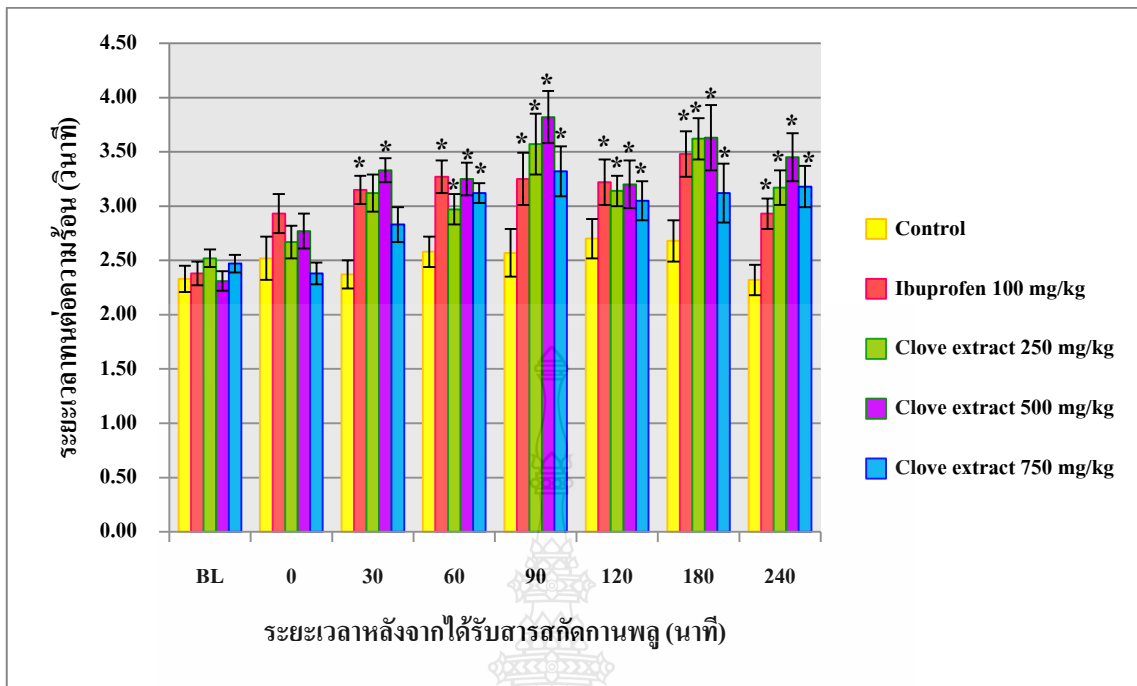
จากผลการทดลองดังกล่าวอาจเกิดจากองค์ประกอบของน้ำมันกานพลูซึ่งจากที่ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) พบว่ามีสาร Eugenol เป็นองค์ประกอบหลักคือ 69.88% ซึ่ง Eugenol มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่และสามารถบรรเทาอาการปวดได้ [121] เนื่องจากยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 และ Lipoxygenase ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสาร Prostaglandin ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดและอักเสบ [122] ในขณะที่ยามาตรฐาน Emla 5% w/w ที่อยู่ในรูปของครีม มีส่วนประกอบของ Lidocaine และ Prilocaine อย่างละ 2.5% โดยตัวยาคจะถูกดูดซึมผ่านผิวหนังและไปยับยั้งการทำงานของระบบประสาทรับความรู้สึกได้ผิวหนังบริเวณนั้นจึงทำให้เกิดอาการชาบริเวณที่ทายา [123] โดยยาชาจะปิดกั้นการส่งกระแสประสาทรับความรู้สึกเพียงชั่วคราวโดยการปิดกั้น Na^+ channels เมื่อมีการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จะยับยั้งการไหลของ Na^+ เข้าเซลล์ในระยะกระตุ้น (Activated Na^+ channels) หรือระยะ Depolarization และทำให้ Na^+ channels ระยะเวลายับยั้ง (Inactivated state หรือ Refractory phase) นานขึ้น [124] หาก Eugenol มีความเข้มข้นสูงเกินไปก็จะทำให้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นความรู้สึกเจ็บปวดที่เกิดจากความร้อน โดยการกระตุ้นที่ Transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) ที่ปลายประสาทรับความรู้สึกปวด ทำให้ Calcium channel เปิด จึงเกิดอาการปวดขึ้น [125]

ตารางที่ 4.1 %MPE ของน้ำมันกานพลูต่อการบรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Tail flick test

Groups	N	%MPE						
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min
Control	6	10.66	-2.95	-9.12	-4.91	-7.29	-8.98	-9.19
Emla 5% w/w	6	21.66	3.94	4.08	-0.56	-2.95	2.67	2.53
Clove oil 1% w/w	6	22.86	-5.17	-2.04	4.76	-4.22	0	5.03
Clove oil 5% w/w	6	18.61	2.54	3.61	2.68	4.42	4.28	12.72
Clove oil 10% w/w	6	10.21	-3.08	-3.50	-4.62	-2.38	0	0

เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพสูงสุดที่คาดว่าจะเป็นไปได้ (Maximal possible effect; %MPE) ดังตารางที่ 4.1 พบว่าน้ำมันกานพลู 5% w/w มี % MPE ต่ำกว่าน้ำมันกานพลูขนาดอื่นหลังจาก 30 นาที เป็นต้นไป

ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดกานพลู (Clove extract) ต่อการบรรเทาอาการปวด แสดงผลของระยะเวลาทนต่อความร้อนดังภาพที่ 4.2 ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกานพลูทุกขนาด (250, 500 และ 750 mg/kg/bw) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของระยะเวลาทนต่อความร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในแต่ละช่วงเวลา นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw แสดงระยะเวลาทนต่อความร้อนได้ดีที่สุดทุกช่วงเวลาของการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกานพลูขนาดอื่น โดยหลังจากที่มีการป้อนสารสกัดกานพลูเป็นเวลา 30 นาที ก็สามารถออกฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ ซึ่งดูจากระยะเวลาการทนต่อความร้อนบริเวณหางหนูที่มีการยกหางหนีจากความร้อนหลังจากที่ให้สารทดสอบในช่วงเวลาต่างๆ เช่นเดียวกับยามาตรฐาน Ibuprofen 100 mg/kg/bw ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของระยะเวลาทนต่อความร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 30-240 นาที



ภาพที่ 4.2ฤทธิ์บรรเทาอาการปวดของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Tail flick test

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

ฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูที่สามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอาจเนื่องมาจากการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารสื่ออักเสบ Prostaglandin เช่นเดียวกับยามาตรฐาน Ibuprofen 100 mg/kg/bw ซึ่งเป็นยาแก้อักเสบชนิดที่ไม่ใช่ สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) แต่เมื่อพิจารณาจาก %MPE ดังตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดกานพลู 500 mg/kg/bw มีประสิทธิภาพในการบรรเทาอาการปวดสูงที่สุดทุกช่วงเวลาของการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกานพลูขนาดอื่น

ตารางที่ 4.2 %MPE ของสารสกัดกานพลูต่อการบรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Tail flick test

Groups	N	%MPE						
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min
Control	6	2.48	0.52	3.26	3.13	4.82	4.56	-0.13
Ibuprofen 100 mg/kg	6	7.22	10.10	11.68	11.42	11.02	14.44	7.22
Clove extract 250 mg/kg	6	2.01	8.02	16.71	14.04	8.29	14.71	8.69
Clove extract 500 mg/kg	6	5.98	13.26	21.98	19.64	11.57	17.17	14.82
Clove extract 750 mg/kg	6	-1.20	4.78	13.28	11.29	7.70	8.63	9.43

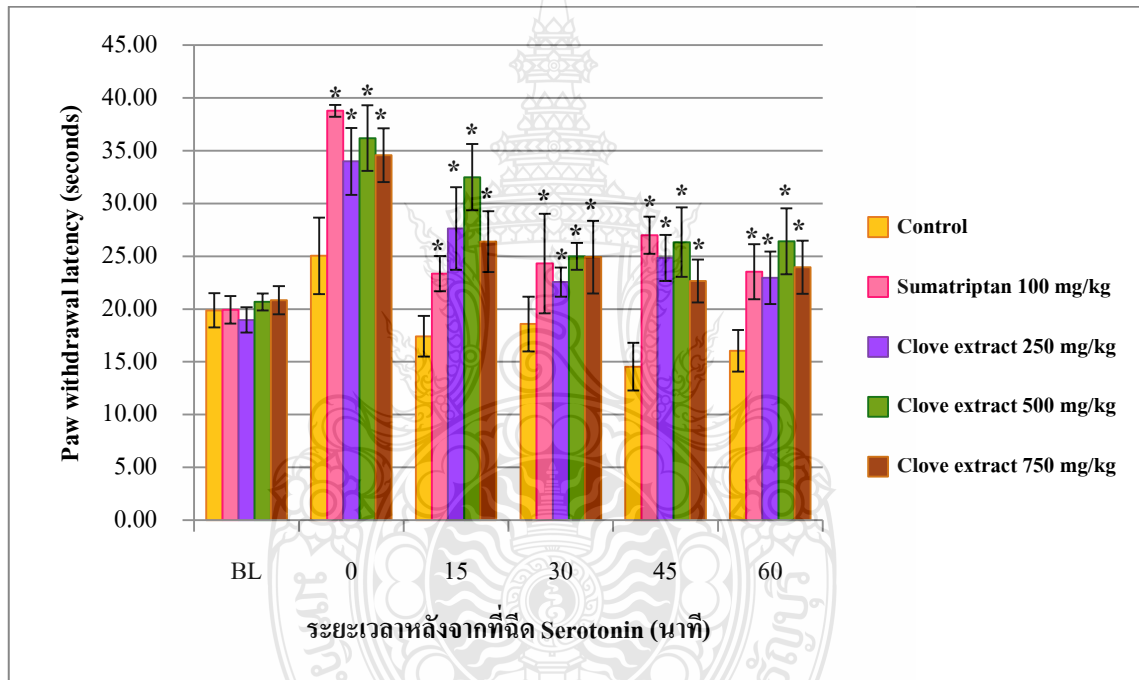
เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากดอกกานพลูด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า สารสกัดจากดอกกานพลูที่นำมาทดสอบมีสารสำคัญ ได้แก่ Eugenol, Eugenol acetate และ trans-Caryophyllene ปริมาณ 62.53, 18.27 และ 10.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ ในการบรรเทาอาการปวดอาจเกิดจากสาร Eugenol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดกานพลู เช่นเดียวกับน้ำมันกานพลูที่มีสาร Eugenol สูงที่สุด

4.1.2 Hot plate test

จากการศึกษาฤทธิ์บรรเทาอาการปวดของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Hot plate test โดยใช้ Serotonin และ Capsaicin เหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดความเจ็บปวดจากความร้อนแสดงผลการทดลองดังนี้

4.1.2.1 Serotonin evoked thermal hyperalgesia

จากการศึกษาฤทธิ์บรรเทาอาการปวดของสารสกัดกานพลู โดยการใช้ Serotonin เหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อนแสดงระยะเวลาการยกเท้าหนีจากความร้อน ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดที่มากกว่าปกติ (Hyperalgesia) ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อ Serotonin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

จากภาพที่ 4.3 แสดงผลของสารสกัดกานพลูในการบรรเทาอาการปวดจาก Serotonin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อนโดยการฉีด Serotonin เข้าใต้ชั้นเท้า (Intraplantar; ipl) ด้านหลังของหนูทดลอง และดูการยกเท้าหนีจากความร้อน (Paw withdrawal latency; PWL) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกานพลูทุกขนาด (250, 500 และ 750 mg/kg/bw) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ ($p < 0.05$) ระยะเวลาการยกเท้าหนีจากความร้อนทุกช่วงเวลาของการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับยา Sumatriptan นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw มี %MPE สูงที่สุดทุกช่วงเวลาของการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกานพลูขนาดอื่นดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 %MPE ของสารสกัดกานพลูต่อ Serotonin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน

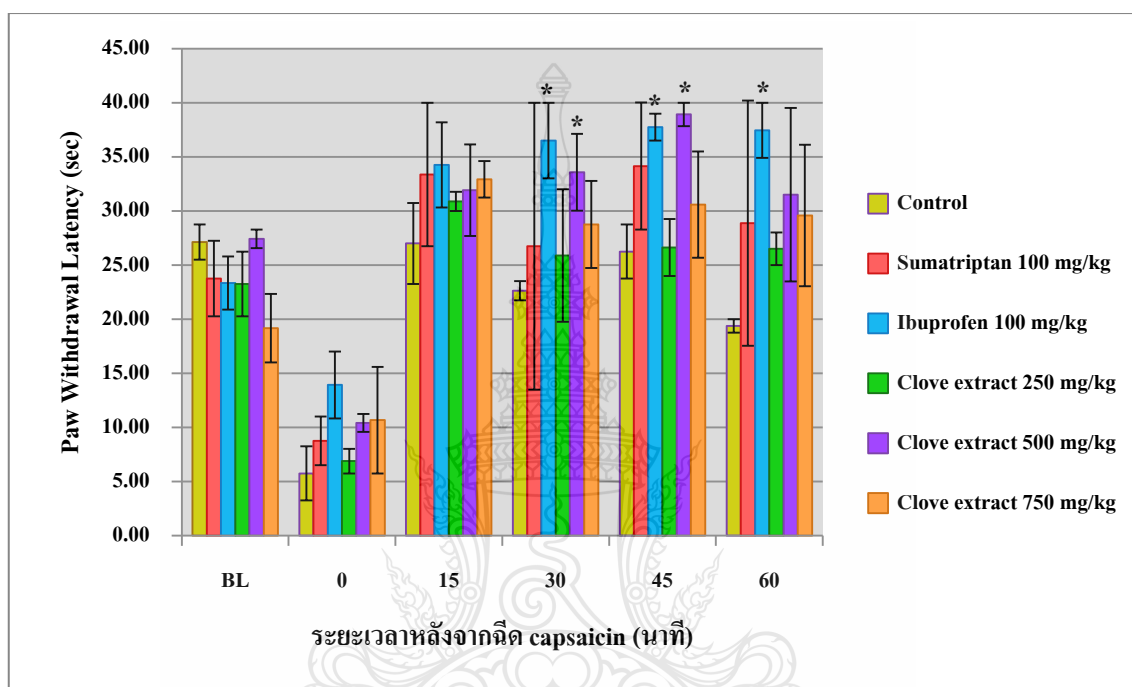
Groups	%MPE				
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Control	25.65	-12.23	-6.46	-26.54	-19.09
Sumatriptan 100 mg/kg	93.97	17.08	21.86	35.26	18.03
Clove extract 250 mg/kg	71.48	41.21	17.06	27.90	19.01
Clove extract 500 mg/kg	80.34	61.20	22.40	29.28	29.75
Clove extract 750 mg/kg	71.73	28.95	21.34	9.49	16.33

สารสื่อประสาท Serotonin (5-HT) จะพบบริเวณระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral serotonergic system) และเป็นตัวควบคุมความเจ็บปวดในระยะเวลาต่างๆ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับอาการปวดไมเกรน เมื่อมีอาการปวดในสภาวะปกติจะมีการหลั่งสารสื่อประสาท Serotonin ออกมา แต่ในการทดลองนี้มีการฉีด Serotonin เข้าไปทำให้ปวดมากกว่าปกติเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่ปกติ เนื่องจาก Serotonin จะเข้าไปกระตุ้น Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) ที่เป็นตัวรับความเจ็บปวดชนิดหนึ่ง (Pain receptor) ทำให้เกิดความเจ็บปวดและมีความไวในการตอบสนองต่อการปวดเพิ่มขึ้น [107] จึงทำให้หนูทดลองยกเท้าหนีจากความร้อนเร็วขึ้น โดยจากผลการทดลองพบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบมีระยะเวลาการทนต่อความร้อนน้อยกว่ากลุ่มยามาตรฐานและกลุ่มสารสกัดกานพลู

จากผลการทดลองนี้เป็นไปได้ว่าสารสกัดกานพลูอาจมีกลไกการออกฤทธิ์บรรเทาอาการปวดไปในทางเดียวกับยา Sumatriptan เนื่องจากยา Sumatriptan เป็นยาบรรเทาอาการปวดไมเกรนในกลุ่ม Serotonin 1B/1D receptor agonist จึงออกฤทธิ์เฉพาะที่ Serotonin receptor ทำให้สามารถบรรเทาอาการปวดได้และจะทำให้ระดับของ Serotonin ที่บริเวณระบบประสาทส่วนปลายลดลง อย่างไรก็ตามได้มีการเก็บ Serum ของสัตว์ทดลองจากการทดลองนี้ไปตรวจหาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin เพื่อดูความเกี่ยวข้องของกลไกว่าไปในทางเดียวกันหรือไม่และเป็นการยืนยันผลการทดลองนี้ ดังผลการทดลองที่ 4.2.1.1

4.1.2.2 Capsaicin-evoked thermal hyperalgesia

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อ Capsaicin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน โดยการฉีด Capsaicin เข้าใต้ผิวหนังด้านหลังของสัตว์ทดลอง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอาการปวดที่มากกว่าปกติ แสดงระยะเวลาการยกเท้าหนีจากความร้อนดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อ Capsaicin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน
* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

จากภาพที่ 4.4 พบว่าสารสกัดกานพลู 500 mg/kg/bw มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของระยะเวลาทนต่อความร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 30 และ 45 นาที หลังจากฉีด Capsaicin เช่นเดียวกับยา Ibuprofen 100 mg/kg/bw ที่เป็นยาบรรเทาอาการปวดในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของระยะเวลาทนต่อความร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 30, 45 และ 60 นาที ส่วนยามาตรฐาน Sumatriptan ไม่สามารถบรรเทาอาการปวดได้ เนื่องจาก Sumatriptan เป็นยาชนิด Serotonin receptor agonist ซึ่งจะจำเพาะกับ Serotonin receptor และเป็นยาออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS drug) [126] จึงไม่สามารถบรรเทาอาการปวดที่เกิดจาก Capsaicin ได้ เพราะ Capsaicin เหนี่ยวนำให้เกิดอาการปวดที่ระบบประสาทส่วนปลายและทำให้ปล่อยสาร Neuropeptide ได้แก่ Substance P (SP), Somatostatin และ CGRP [127] ซึ่งเป็นการยืนยันว่ากลไกของ Sumatriptan อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับ Capsaicin

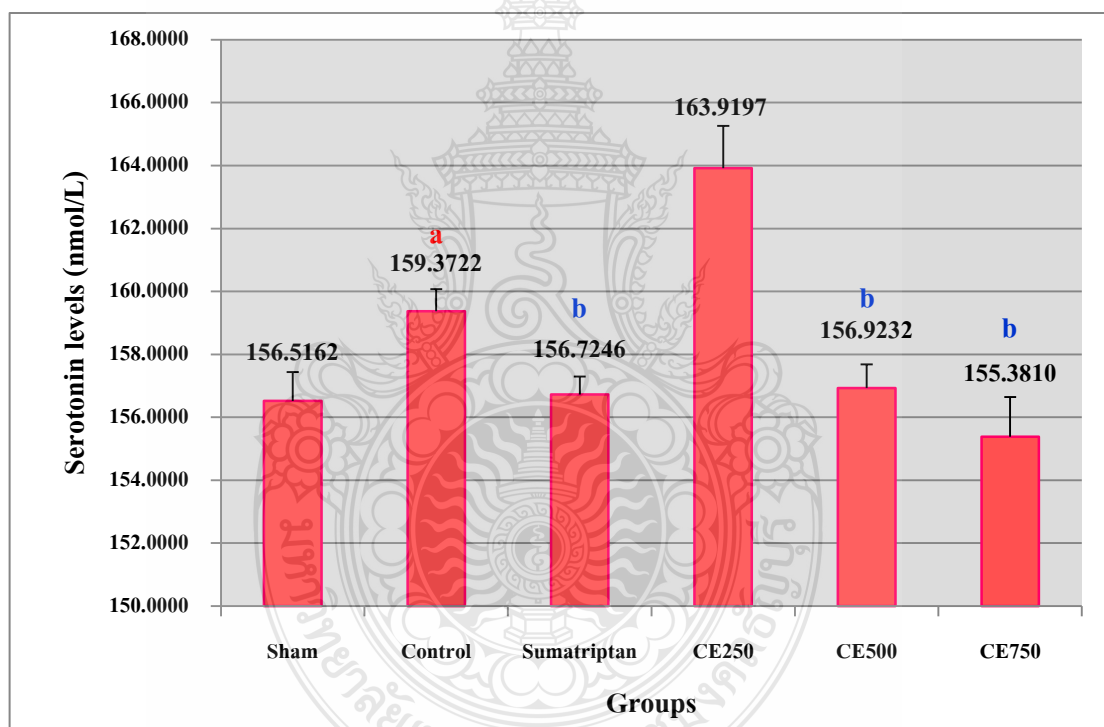


4.2 ผลของสารสกัดกานพลูต่อระดับสารสื่อประสาท Serotonin

4.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

4.2.1.1 วิเคราะห์ระดับของสารสื่อประสาท Serotonin จาก Serum ของสัตว์ทดลอง จากการทดลอง Serotonin-evoked thermal hyperalgesia

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกานพลู (Clove extract; CE) และวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ใน Serum ของสัตว์ทดลอง โดยนำตัวอย่าง Serum จากการทดลอง Serotonin ที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อน โดยการฉีด Serotonin เข้าที่ระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral nervous system) มาตรวจวิเคราะห์ แสดงระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลของสารสกัดกานพลูต่อระดับสารสื่อประสาท Serotonin ใน Serum ของสัตว์ทดลอง

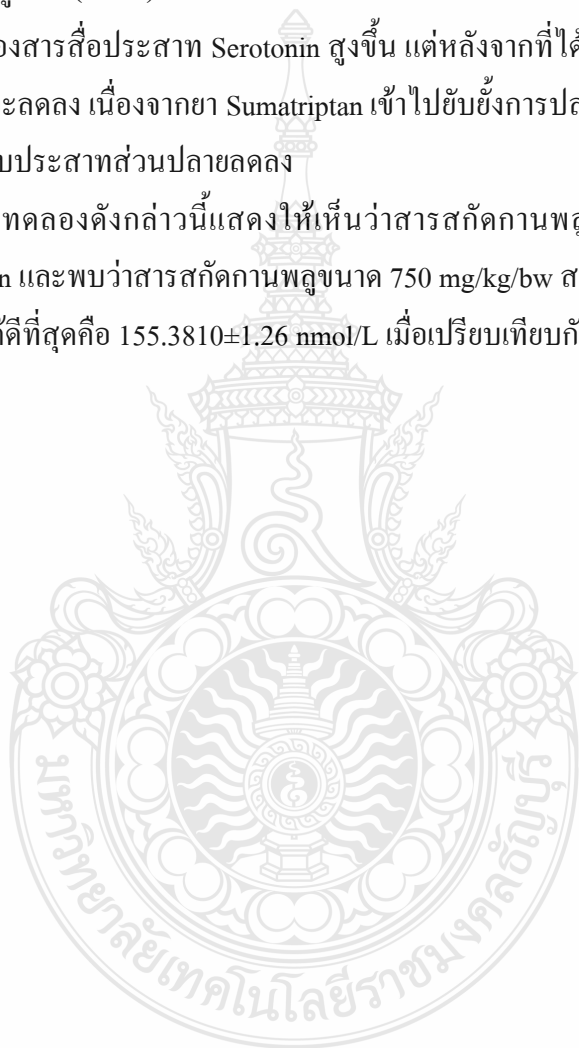
จากการทดลอง Serotonin-evoked thermal hyperalgesia

^a มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham

^b มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control

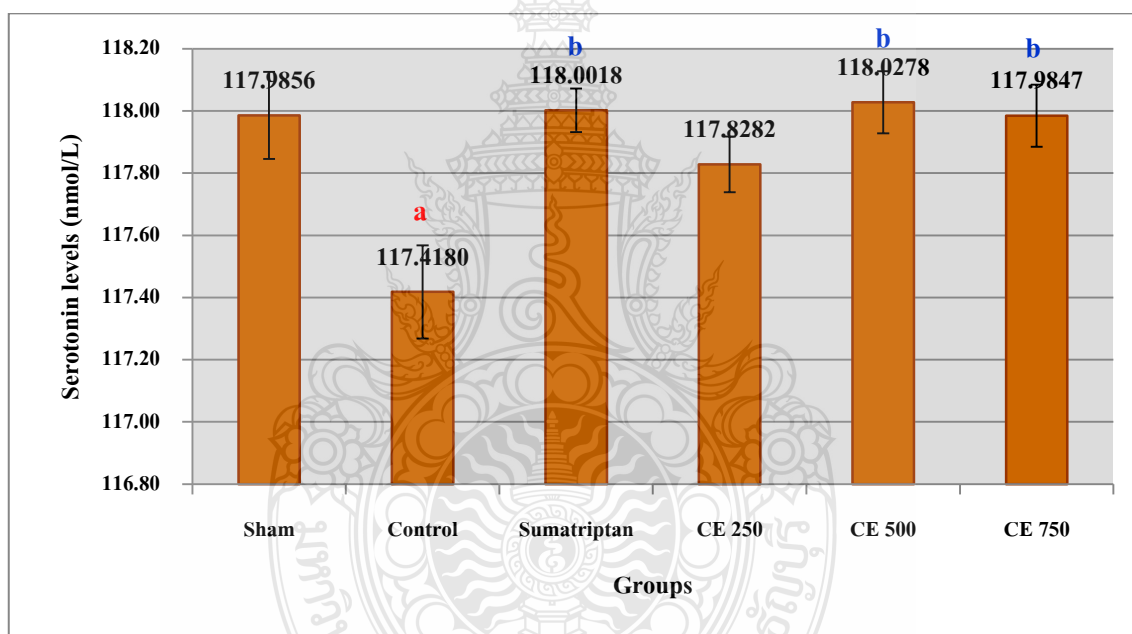
ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 500 และ 750 mg/kg/bw มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของระดับสารสื่อประสาท Serotonin เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดกานพลูทั้งสองขนาดช่วยลดระดับของ Serotonin ซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อนที่บริเวณระบบประสาทส่วนปลายได้ เช่นเดียวกับยา Sumatriptan นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของระดับของสารสื่อประสาท Serotonin เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ (Sham) แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการฉีด Serotonin เข้าที่ระบบประสาทส่วนปลายจะทำให้ระดับของสารสื่อประสาท Serotonin สูงขึ้น แต่หลังจากที่ได้รับยาและสารสกัดกานพลูระดับของ Serotonin จะลดลง เนื่องจากยา Sumatriptan เข้าไปยับยั้งการปล่อยของ Serotonin จึงทำให้ Serotonin บริเวณระบบประสาทส่วนปลายลดลง

จากผลการทดลองดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกานพลูมีการออกฤทธิ์ไปในทางเดียวกับยา Sumatriptan และพบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw สามารถลดระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ได้ดีที่สุดคือ 155.3810 ± 1.26 nmol/L เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกานพลูขนาดอื่น



4.2.1.2 วิเคราะห์ระดับของสารสื่อประสาท Serotonin จากตัวอย่างสมองของสัตว์ทดลองจากการทดลอง Reserpine-induced low serotonin level

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกานพลู (Clove extract; CE) โดยการทดลองจะใช้ Reserpine ที่มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้ระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ลดลง ซึ่งการที่มีระดับของ Serotonin ในปริมาณน้อยเป็นสาเหตุของอาการปวดไมเกรน โดยทำการฉีด Reserpine ขนาด 0.25 mg/kg/bw เข้าบริเวณช่องท้อง (Intraperitoneal injection; ip) ของสัตว์ทดลองเป็นเวลา 9 วัน และมีการเริ่มให้สารทดสอบในวันที่ 3 ถึงวันสุดท้ายของการทดสอบและทำการเก็บสมองของสัตว์ทดลองมาวิเคราะห์ระดับของสารสื่อประสาท Serotonin โดยใช้ชุด Serotonin Research ELISA (BA E-5900 ; Labor Diagnostika Nord GmbH, Germany) แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ผลของสารสกัดกานพลูต่อระดับสารสื่อประสาท Serotonin ในสมองของสัตว์ทดลองจากการทดลอง Reserpine-induced low serotonin level

^a มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham

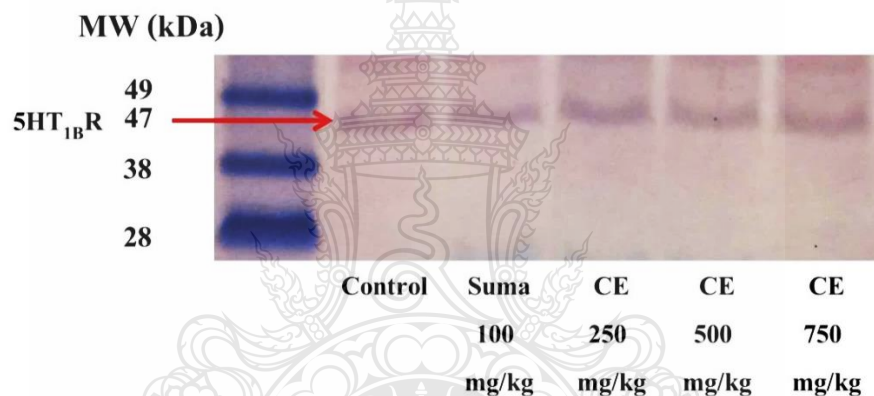
^b มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 500 และ 750 mg/kg/bw มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของระดับสารสื่อประสาท Serotonin เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย สารสกัดกานพลูทั้งสองขนาดช่วยเพิ่มระดับของ Serotonin ในสมองของสัตว์ทดลองได้เช่นเดียวกับยา Sumatriptan นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw สามารถเพิ่มระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ได้ดีที่สุดคือ 118.0278 ± 0.10 nmol/L เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกานพลูขนาดอื่น ซึ่งผลการทดลองข้างต้นมีความสอดคล้องกับ Wu et al., 2014 นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นว่า นอกจากสารสื่อประสาท Serotonin (5-HT) แล้วยังมี Beta-endorphin (β -EP) และ Dopamine (DA) ที่มีบทบาทสำคัญกับการปวดไมเกรน [128]



4.3 ผลการตรวจติดตามโปรตีน 5-HT_{1B} ด้วยวิธี Western blotting technique

จากการนำตัวอย่างสมอง (Whole brain) จากการทดลอง Reserpine-induced low serotonin level มาทำการสกัดโปรตีนและนำส่วนของ Supernatant ไปทำการตรวจติดตามโปรตีน Serotonin ที่สนใจบน Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยวิธี Western blotting technique ซึ่ง Serotonin เป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการปวดไมเกรน โดยการใช้ Rabbit polyclonal 5-HT_{1B} receptor antibody (5HT_{1B}R) เป็น Primary antibody และใช้ Anti-rabbit-conjugated เป็น Secondary antibody ในการตรวจติดตาม ซึ่งน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight; MW) ของ 5HT_{1B}R ที่ต้องการติดตามมีขนาดประมาณ 47 kDa ผลการแสดงผลของโปรตีนแสดงดังภาพที่ 4.7



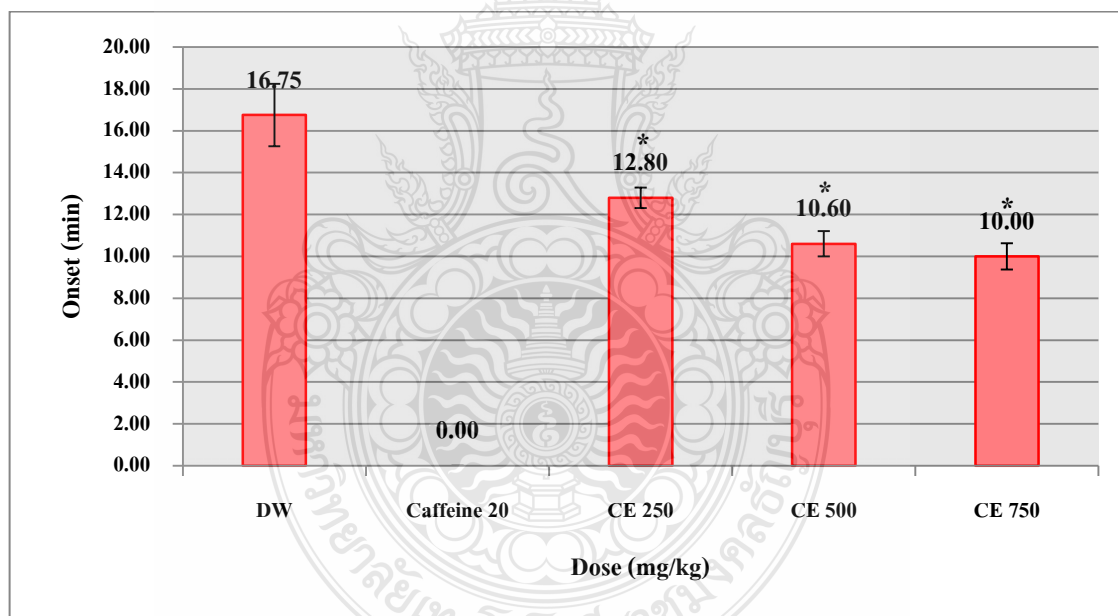
ภาพที่ 4.7 การแสดงผลของโปรตีน 5HT_{1B}R ด้วยวิธี Western blotting technique

จากการแสดงผลของโปรตีนดังภาพที่ 4.7 พบว่าตัวอย่างของโปรตีนประกอบด้วยโปรตีนของกลุ่มควบคุม กลุ่มยามาตรฐาน Sumatriptan และกลุ่มของสารสกัดกานพลูขนาดต่างๆ (250, 500 และ 750 mg/kg/bw) โดยโปรตีนของทุกกลุ่มที่พบมีขนาด 47 kDa ซึ่งเป็นแถบของโปรตีน 5HT_{1B}R โดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของ Marker แสดงให้เห็นว่าหลังจากที่สัตว์ทดลองได้รับสารสกัดกานพลูทุกขนาดมีความจำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการ โดยมีขนาดความเข้มและความหนาของ Band มากกว่ากลุ่มควบคุม จึงเป็นการยืนยันว่าวิธีการทดลองที่ใช้เลียนแบบอาการปวดไมเกรนในสัตว์ทดลองมีความเกี่ยวข้องกับการปวดไมเกรนและสารสกัดกานพลูสามารถมีฤทธิ์รักษาอาการปวดไมเกรนได้เช่นเดียวกับยา Sumatriptan ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Berman et al., 2006 และ Harriott and Gold, 2008 ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากดอกกานพลูอาจมีฤทธิ์เป็น Serotonin agonist

4.4 ผลของสารสกัดกานพลูต่อฤทธิ์การนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อ

4.4.1 Sleeping time

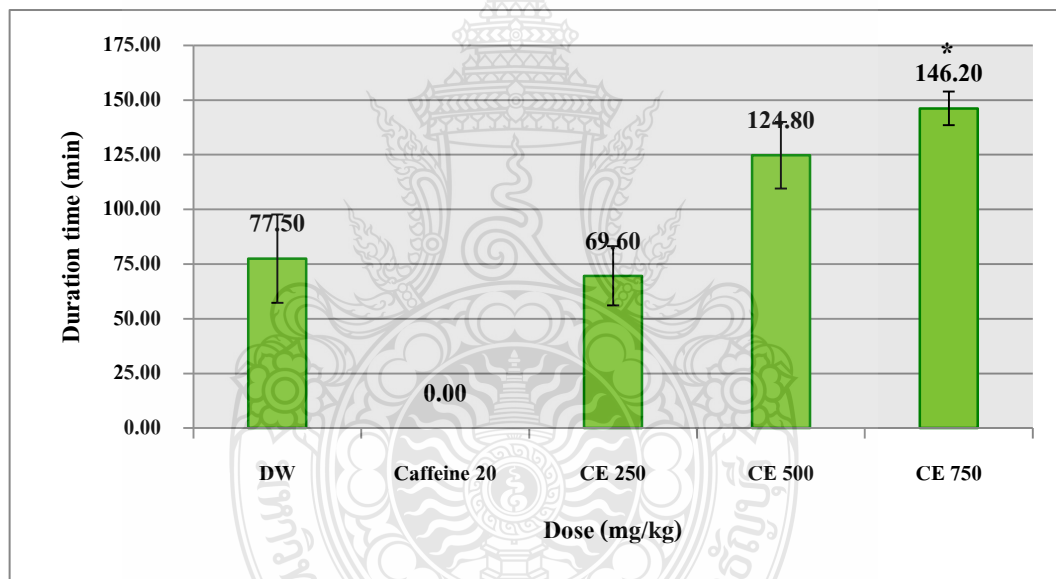
จากการศึกษาผลของสารสกัดกานพลูต่อฤทธิ์การนอนหลับในสัตว์ทดลอง เนื่องจากในผู้ที่มีอาการปวดศีรษะไมเกรนไม่รุนแรง การได้พักหรือนอนหลับ เป็นการช่วยลดความถี่ของการปวดศีรษะไมเกรนได้อย่างหนึ่งและยาที่ใช้ในการป้องกันการเกิดอาการปวดศีรษะไมเกรน (Preventive or prophylactic medicine) ที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่มีฤทธิ์ทำให้นอนหลับและพักผ่อนได้ เช่น ยาด้านอาการซึมเศร้ากลุ่ม Tricyclics, กลุ่ม β -blocker [129] ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูต่อการนอนหลับเพื่อใช้เป็นข้อมูลอีกหนึ่งแนวทางในการลดความถี่ของการเกิดอาการปวดศีรษะไมเกรน โดยการให้สารสกัดกานพลูทั้ง 3 ขนาด (250, 500 และ 750 mg/kg/bw) และเหนี่ยวนำให้หนูทดลองเกิดการนอนหลับ ด้วยยา Diazepam หลังจากนั้นสังเกตพฤติกรรมและบันทึกระยะเวลาการนอนหลับซึ่งแสดงฤทธิ์ดังภาพที่ 4.8 และภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.8 Onset ของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Sleeping time

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

ผลการทดลองพบว่าการออกฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูขึ้นอยู่กับขนาดของสารสกัด (Dose dependent manner) โดยสารสกัดกานพลูทุกขนาด (250, 500 และ 750 mg/kg/bw) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของ Onset (ระยะเวลาตั้งแต่ป้อนยา Diazepam ถึงระยะเวลาที่หนูเริ่มหลับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4.8 ซึ่งสารสกัดกานพลูขนาด 750 mg/kg สามารถทำให้หนูทดลองเริ่มหลับได้เร็วที่สุดคือ 10.00 ± 0.63 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกานพลูขนาดอื่นและสารสกัดกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของ Duration time (ระยะเวลาตั้งแต่ที่หนูเริ่มหลับถึงเวลาที่หนูตื่น) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4.9 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 750 mg/kg/bw ออกฤทธิ์ทำให้หนูทดลองหลับได้นานที่สุดคือ 146.20 ± 7.66 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกานพลูขนาดอื่น ส่วนสารมาตรฐาน Caffeine ไม่สามารถทำให้หนูทดลองหลับได้



ภาพที่ 4.9 Duration time ของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Sleeping time

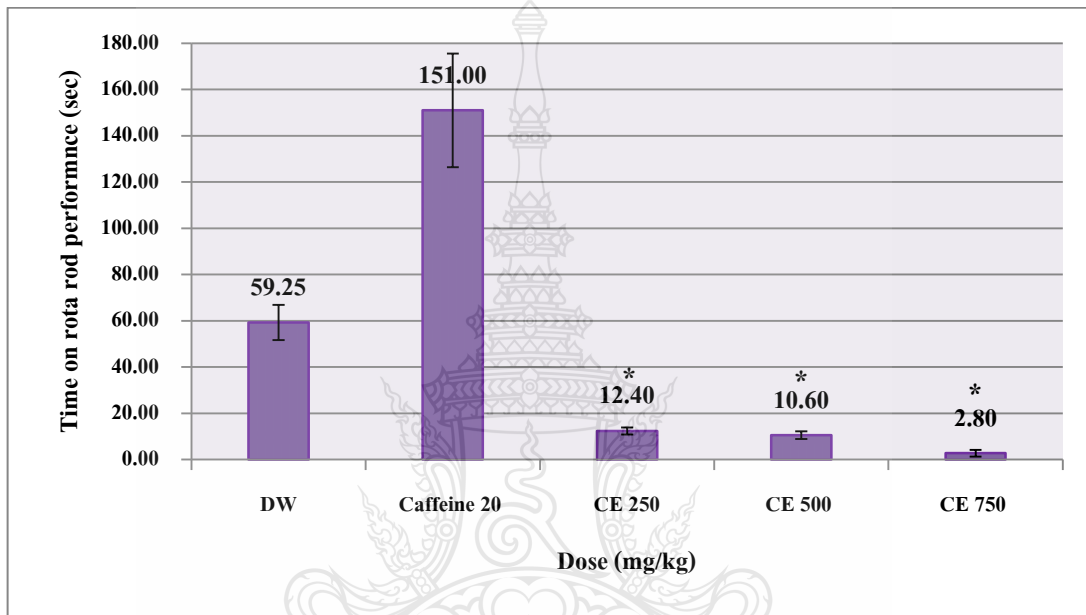
* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

การออกฤทธิ์ของสารสกัดกานพลูในการนอนหลับจากผลการทดลองดังกล่าวนี้ออกฤทธิ์ไปในทางเดียวกับยา diazepam เป็นยาในกลุ่ม Benzodiazepines ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง โดยยาจะจับกับ $GABA_A$ receptors ที่ Benzodiazepines receptor ทำให้ $GABA$ และ $GABA_A$ receptors จับกันได้มากขึ้น และ Cl^- ไหลเข้าเซลล์ประสาทมากขึ้น ทำให้เกิด Hyperpolarization หรือลดการเกิด Depolarization [124] ส่วนกลุ่มสารมาตรฐาน affeine ไม่สามารถทำให้หนูหลับได้ เนื่องจาก caffeine มีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง (CNS stimulant) และเพิ่มการหลั่งของ Norepinephrine ในสมอง จึงทำให้ระบบประสาทเกิดการตื่นตัว [130, 131]



4.4.2 Muscle relaxant activity

จากการศึกษาผลของสารสกัดกานพลูต่อความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อ โดยใช้ทดสอบร่วมกับวิธี Sleeping time เนื่องจากหนูทดลองปกติที่ไม่ได้รับยา diazepam จะเดินสัมพันธ์กันโดยไม่ตกจาก Rota rod แต่เมื่อหนูทดลองได้รับยาจะเดินไม่สัมพันธ์กันและตกจาก Rota rod ซึ่งผลของสารสกัดกานพลูต่อความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อ (Muscle coordination) แสดงดังภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ผลของสารสกัดกานพลูต่อระยะเวลา (วินาที) ที่สัตว์ทดลองสามารถเดินบน Rota rod * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกานพลูทุกขนาด (250, 500 และ 750 mg/kg/bw) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของระยะเวลาที่หนูเดินบน Rota rod ความเร็ว 20 รอบต่อนาที (rpm) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นไปในลักษณะที่ขึ้นกับขนาดของยา (Dose dependent manner) การที่หนูทดลองตกจาก Rota rod เกิดจากฤทธิ์ของยา Diazepam นอกจากจะทำให้เกิดอาการง่วง (Sedation) และทำให้หลับ (Hypnotic) แล้วยังมีฤทธิ์ในการคลายกล้ามเนื้อ (Muscle relaxation) โดยจะจับกับ α_2 -GABA_A receptors ที่ปลายประสาท (ด้าน Presynaptic membrane) ในไขสันหลัง [124, 132]

4.5 ผลของน้ำมันและสารสกัดกานพลูในการต้านการอักเสบ

4.5.1 EPP-induced rat ear edema

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันกานพลูด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema เนื่องจากที่ได้มีการศึกษาเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าพยาธิกำเนิดของการปวดไม่เกรนเกิดจากการอักเสบและมีการขยายตัวของหลอดเลือดจึงทำให้มีการหลั่งสารสื่อกลาง (Chemical mediator) ในการอักเสบขึ้น เช่น Histamine, Serotonin, Prostaglandin เป็นต้น ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองร่วมด้วย โดยหลังจากให้น้ำมันกานพลูทั้ง 3 ความเข้มข้น (1%, 7.5% และ 15% v/v) และเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลันบริเวณใบหูของหนูทดลองโดยใช้ EPP หลังจากนั้นวัดความหนาของใบหูที่เวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันกานพลูความเข้มข้นต่างๆ แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบบริเวณใบหูของหนูทดลองในทุกช่วงเวลาของการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยน้ำมันกานพลูทุกขนาดความเข้มข้นสามารถยับยั้งการอักเสบที่ใบหูหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทุกช่วงเวลาของการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับยามาตรฐาน Phenylbutazone นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันกานพลู 7.5% v/v มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการอักเสบสูงที่สุดคือ 36.72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันกานพลูความเข้มข้นอื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันกานพลูด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema

Groups	N	Ear thickness (mean \pm s.e.)		
		0.5 h	1 h	2 h
Control	6	10.67 \pm 0.56	11.33 \pm 0.49	10.50 \pm 0.76
Phenylbutazone 5% w/v	6	8.00 \pm 0.37 ^a	7.33 \pm 0.33 ^a	7.00 \pm 0.37 ^a
Clove oil 1% v/v	6	8.83 \pm 0.48 ^a	8.33 \pm 0.21 ^a	7.67 \pm 0.42 ^a
Clove oil 7.5% v/v	6	8.33 \pm 0.42 ^a	7.17 \pm 0.48 ^a	6.83 \pm 0.46 ^a
Clove oil 15% v/v	6	7.33 \pm 0.33 ^a	7.67 \pm 0.42 ^a	8.33 \pm 0.76 ^a

^a มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

ตารางที่ 4.5 %inhibition ของน้ำมันกานพลูด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema

Groups	% inhibition		
	0.5 h	1 h	2 h
Control	-	-	-
PBZ 5% w/v	25.02	35.30	33.33
Clove oil 1% v/v	17.24	26.48	26.95
Clove oil 7.5% v/v	21.93	36.72	34.95
Clove oil 15% v/v	31.30	32.30	20.67

4.5.2 Carrageenan-induced rat paw edema

จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดกานพลู (Clove extract) ในสัตว์ทดลอง เมื่อทดสอบด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema หลังจากให้สารสกัดกานพลูทั้ง 3 ขนาด (250, 500 และ 750 mg/kg/bw) และเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน โดยการฉีด Carrageenan 1% w/v เข้าที่อุ้งเท้าหลังของหนูทดลอง จากนั้นวัดปริมาตรของอุ้งเท้าที่เวลา 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดกานพลูขนาดต่างๆ แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบบริเวณอุ้งเท้าของหนูทดลองในทุกช่วงเวลาของการทดสอบดังตารางที่ 4.6 โดยสารสกัดกานพลูทุกขนาดสามารถยับยั้งการอักเสบของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทุกช่วงเวลาของการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งดูจากปริมาตรของอุ้งเท้าหนู (Paw volume) เช่นเดียวกับยามาตรฐาน Phenylbutazone นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดกานพลู 750 mg/kg/bw มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการอักเสบสูงที่สุดคือ 72.97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกานพลูขนาดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema

Groups	N	Paw volume (mean \pm s.e.)		
		1 h	2 h	3 h
Control	6	0.37 \pm 0.05	0.46 \pm 0.05	0.57 \pm 0.04
Phenylbutazone 250 mg/kg	6	0.13 \pm 0.02 ^a	0.09 \pm 0.02 ^a	0.07 \pm 0.02 ^a
Clove extract 250 mg/kg	6	0.18 \pm 0.04 ^a	0.32 \pm 0.05 ^a	0.36 \pm 0.04 ^a
Clove extract 500 mg/kg	6	0.18 \pm 0.01 ^a	0.36 \pm 0.02 ^a	0.42 \pm 0.02 ^a
Clove extract 750 mg/kg	6	0.10 \pm 0.01 ^a	0.30 \pm 0.03 ^a	0.34 \pm 0.02 ^a

^a มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey's post hoc test

ตารางที่ 4.7 %inhibition ของสารสกัดกานพลูด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema

Groups	% inhibition		
	1 h	2 h	3 h
Control	-	-	-
Phenylbutazone 250 mg/kg	64.86	80.43	87.72
Clove extract 250 mg/kg	51.35	30.43	36.84
Clove extract 500 mg/kg	51.35	21.74	26.32
Clove extract 750 mg/kg	72.97	34.78	40.35

จากผลการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองทำให้ทราบว่า การออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของน้ำมันและสารสกัดกานพลูน่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับสารสื่อการอักเสบ Prostaglandin ซึ่งน้ำมันและสารสกัดกานพลูมีสาร Eugenol ที่เป็นองค์ประกอบหลัก มีคุณสมบัติเป็นยาชาเฉพาะที่และทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัวเมื่อได้รับน้ำมันกานพลูในความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงสามารถลดการบวมของใบหูได้ โดยวิธีการทาลงบนใบหู เมื่อทดสอบด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema หลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดด้วย EPP ซึ่ง EPP เป็นสาเหตุให้เกิดการหลั่งของสารสื่ออักเสบต่างๆ ได้แก่ Histamine, Serotonin และ Prostaglandin จึงก่อให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือดและทำให้เกิดการบวมน้ำ [133] นอกจากนี้สารสกัดกานพลูขนาดที่เหมาะสมก็สามารถลดการบวมของอุ้งเท้าหนูได้เช่นกัน เมื่อสัตว์ทดลองได้รับด้วยวิธีการป้อน โดยทดสอบด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema ซึ่งการอักเสบในวิธีการนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย Carrageenan โดย Carrageenan จะกระตุ้นการหลั่งของ Histamine, Serotonin และ Bradykinin ทำให้มี Prostaglandin สูงขึ้นจึงทำให้เกิดการอักเสบ [134]

ดังนั้น จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันและสารสกัดกานพลูทั้งสองวิธีการนี้สามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้เช่นเดียวกับยามาตรฐาน Phenylbutazone ที่เป็นยาแก้อักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) โดยจะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารสื่อการอักเสบ Prostaglandin จึงทำให้สามารถต้านการอักเสบดังกล่าวได้

บทที่ 5

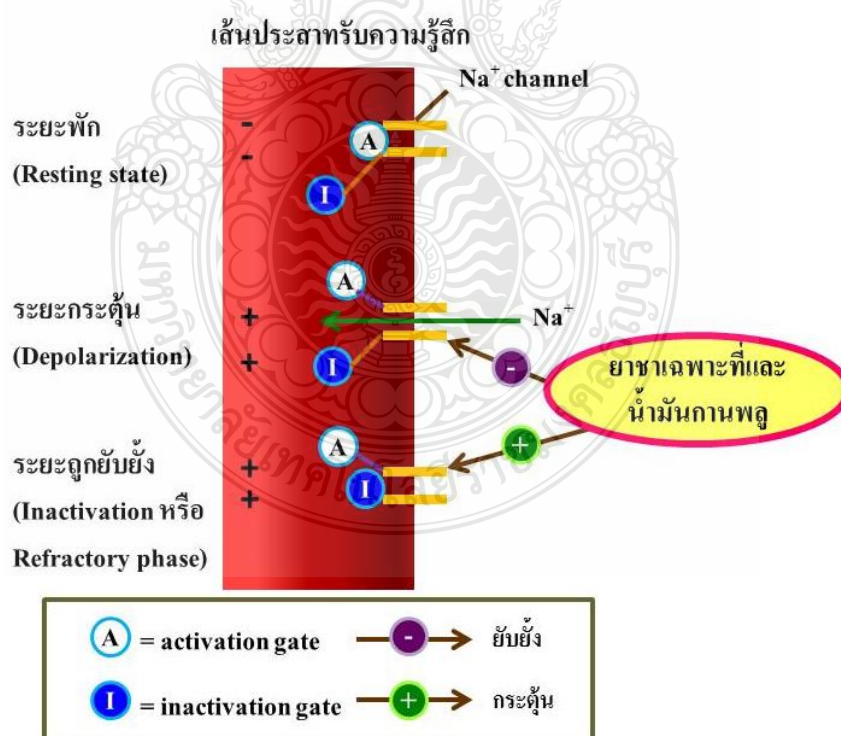
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูในการบรรเทาอาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียงในสัตว์ทดลองโดยใช้วิธีการต่างๆ สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

5.1.1 การศึกษาฤทธิ์บรรเทาอาการปวดของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลู

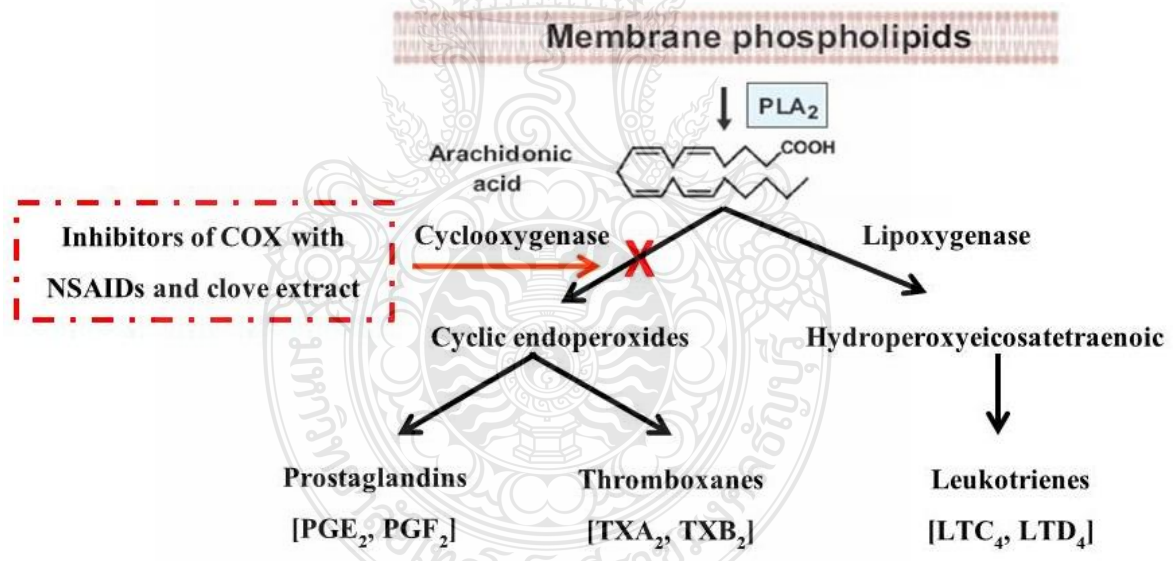
5.1.1.1 Tail flick test จากการทดสอบฤทธิ์บรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Tail flick test ทำให้ทราบว่าน้ำมันกานพลู 5% w/w มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์จะยับยั้งการทำงานของระบบประสาทรับความรู้สึกได้ผิวหนังบริเวณนั้น จึงทำให้เกิดอาการชาบริเวณที่ทายา [123] เช่นเดียวกับยามาตรฐาน Emla 5% w/w ที่อยู่ในรูปของครีมซึ่งมีส่วนประกอบของ Lidocaine และ Prilocaine อย่างละ 2.5% โดยการออกฤทธิ์ของยาชาและน้ำมันกานพลูโดยสรุป แสดงดังภาพที่ 5.1



ภาพที่ 5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาชาเฉพาะที่และน้ำมันกานพลู [124]

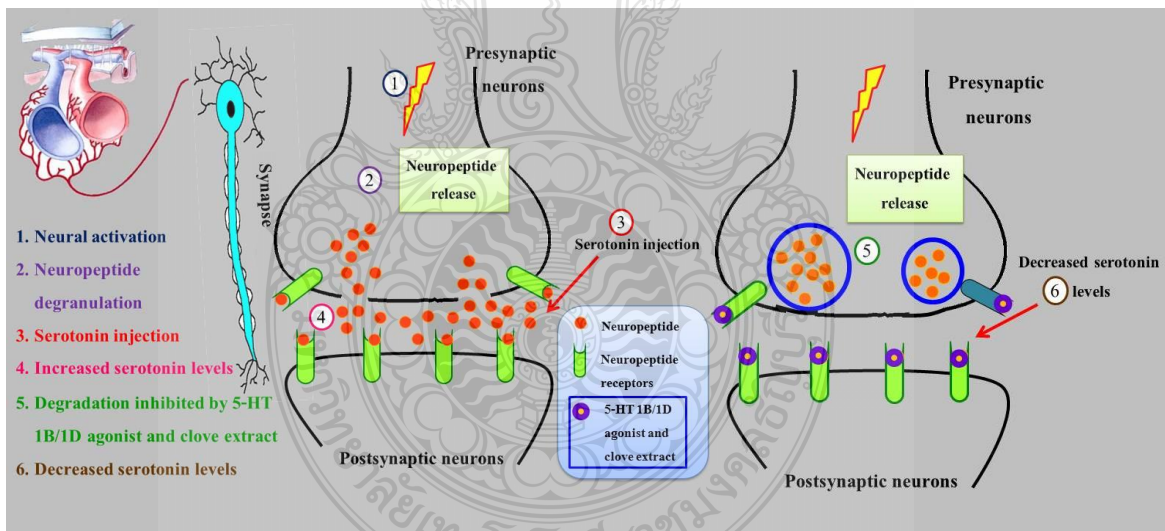
จากภาพที่ 5.1 ยาชากจะปิดกั้นการส่งกระแสประสาทรับความรู้สึกเพียงชั่วคราวโดยการปิดกั้น Na^+ channels เมื่อมีการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จะยับยั้งการไหลของ Na^+ เข้าเซลล์ในระยะกระตุ้น (Activated Na^+ channels) หรือระยะ Depolarization และทำให้ Na^+ channels ระยะยับยั้ง (Inactivated state หรือ Refractory phase) นานขึ้น [124] หาก Eugenol มีความเข้มข้นสูงเกินไปก็จะทำให้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นความรู้สึกเจ็บปวดที่เกิดจากความร้อน โดยการกระตุ้นที่ Transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) ที่ปลายประสาทรับความรู้สึกปวด ทำให้ Calcium channel เปิด จึงเกิดอาการปวดขึ้น [125]

ในขณะที่สารสกัดกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw ก็มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้เช่นเดียวกับ ยามาตรฐาน Ibuprofen 100 mg/kg เนื่องจากเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสาร Prostaglandin ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดและอักเสบ [122] ดังแสดงในภาพที่ 5.2 ซึ่งเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดอาจเกิดจากสาร Eugenol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดกานพลู



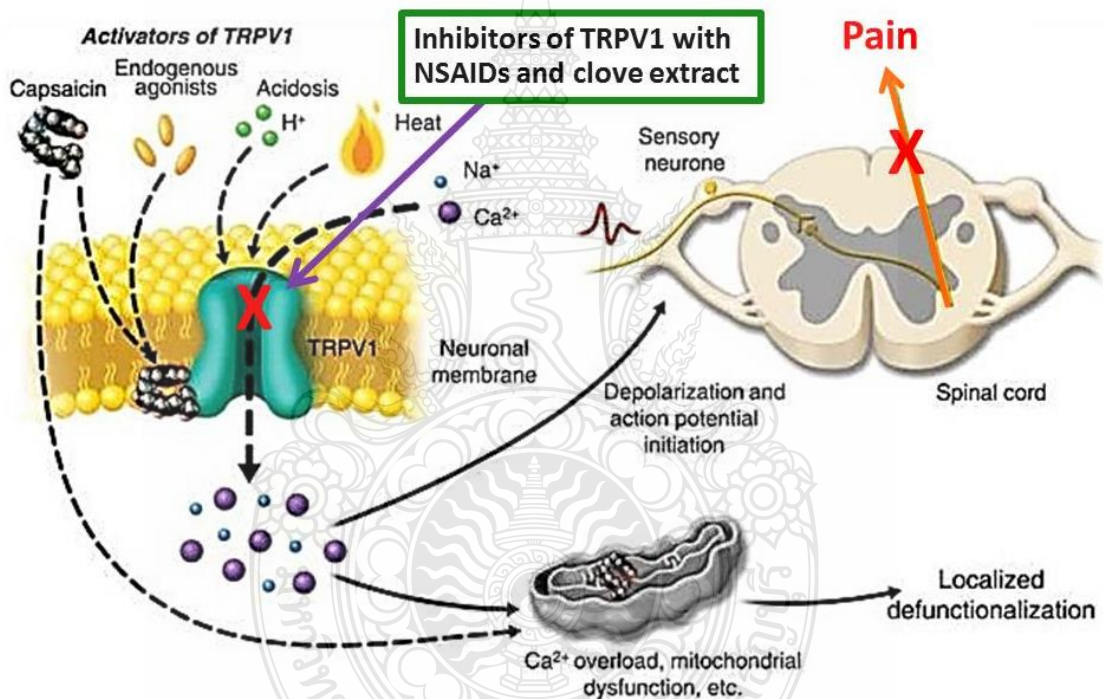
ภาพที่ 5.2 กลไกการออกฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดของยากุ่ม NSAIDs และสารสกัดจากดอก กานพลู [135]

5.1.1.2 Hot plate test โดยใช้ Serotonin เหนียวน่าให้เกิดความเจ็บปวดจากความร้อนที่มากกว่าปกติ (Thermal hyperalgesia) พบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้เช่นเดียวกับยามาตรฐาน Sumatriptan 100 mg/kg/bw เมื่อมีอาการปวดในสภาวะปกติจะมีการหลั่งสารสื่อประสาท Serotonin ออกมา แต่ในการทดลองนี้มีการฉีด Serotonin เข้าไปทำให้ปวดมากกว่าปกติเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่ปกติ เนื่องจาก Serotonin จะเข้าไปกระตุ้นทำงานของ Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) ที่เป็นตัวรับความเจ็บปวดชนิดหนึ่ง (Pain receptor) ทำให้เกิดความเจ็บปวดและมีความไวในการตอบสนองต่อการปวดเพิ่มขึ้น [107] จึงทำให้หนูทดลองยกเท้าหนีจากความร้อนเร็วขึ้น และเมื่อนำ Serum ของสัตว์ทดลองมาวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ด้วยวิธี ELISA พบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 500 และ 750 mg/kg/bw สามารถลดระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ที่ระบบประสาทส่วนปลายได้เช่นเดียวกับยา Sumatriptan เนื่องจากยา Sumatriptan เป็นยาบรรเทาอาการปวดไมเกรนในกลุ่ม Serotonin 1B/1D receptor agonist จึงออกฤทธิ์เฉพาะที่ Serotonin receptor ทำให้สามารถบรรเทาอาการปวดและทำให้ระดับของ Serotonin ที่บริเวณระบบประสาทส่วนปลายลดลง ดังแสดงในภาพที่ 5.3



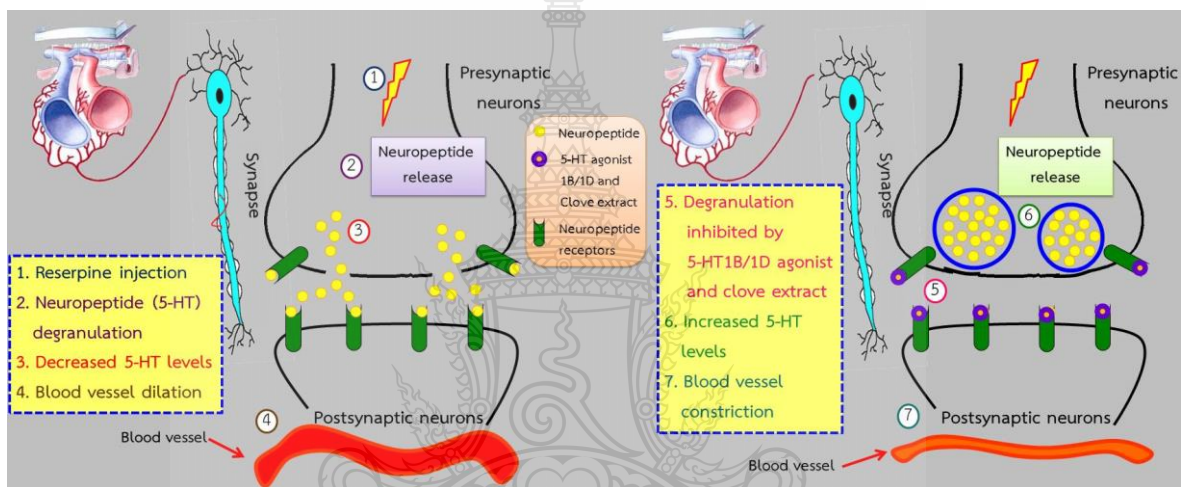
ภาพที่ 5.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Sumatriptan และสารสกัดกานพลูต่อการลดระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ที่ระบบประสาทส่วนปลาย เมื่อวิเคราะห์จาก Serum ของสัตว์ทดลอง [107]

ส่วนการใช้ Capsaicin เหนียวน้ำให้เกิดความเจ็บปวด พบว่าสารสกัดกานพลูขนาด 500 mg/kg/bw มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ เช่นเดียวกับยา Ibuprofen 100 mg/kg/bw เนื่องจากสารสกัดกานพลูอาจมีฤทธิ์ยับยั้ง TRPV1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับความรู้สึกรู้สึกปวด (Pain receptor) ชนิดหนึ่ง จึงทำให้สามารถบรรเทาอาการปวดที่เกิดจาก Capsaicin ได้ ส่วนยา Sumatriptan ไม่สามารถบรรเทาอาการปวดจาก Capsaicin ได้เนื่องจากยา Sumatriptan เป็นยาบรรเทาอาการปวดไมเกรนชนิด Serotonin receptor agonist โดยจะจำเพาะกับ Serotonin receptor และเป็นยาออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS drug) [126] ส่วน Capsaicin เหนียวน้ำให้เกิดความเจ็บปวดที่ระบบประสาทส่วนปลาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกของ Sumatriptan และ Capsaicin อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกัน



ภาพที่ 5.4 กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม NSAIDs และสารสกัดดอกกานพลูในการบรรเทาอาการปวดที่เกิดจาก Capsaicin [136]

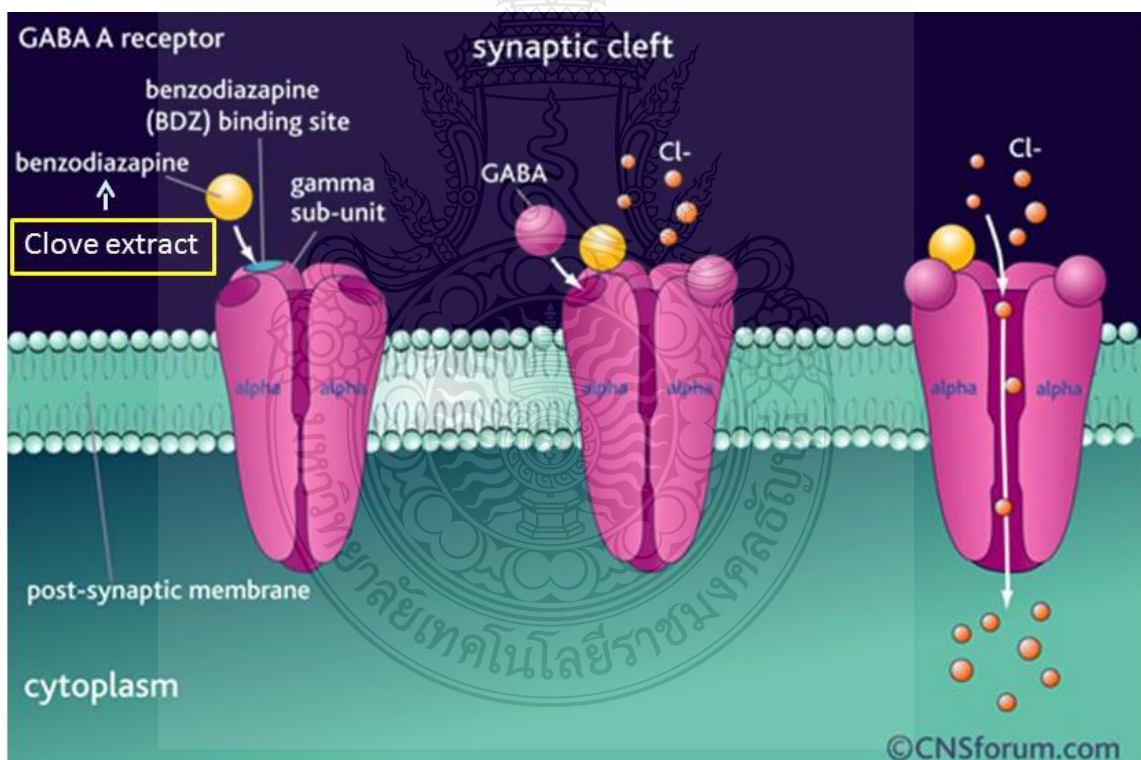
5.1.2 การศึกษาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ในสมองของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Reserpine-induced low serotonin level เพื่อวิเคราะห์หาระดับของสารสื่อประสาท Serotonin พบว่า สารสกัดกานพลูขนาด 500 และ 750 mg/kg/bw สามารถเพิ่มระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ในสมองของสัตว์ทดลองได้เช่นเดียวกับยา Sumatriptan ดังแสดงในภาพที่ 5.5 ซึ่งผลการทดลองข้างต้นมีความสอดคล้องกับ Wu et al., 2014 นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นว่า นอกจากสารสื่อประสาท Serotonin (5-HT) แล้วยังมี Beta-endorphin (β -EP) และ Dopamine (DA) ที่มีบทบาทสำคัญกับการปวดไมเกรน [128]



ภาพที่ 5.5 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Sumatriptan และสารสกัดจากดอกกานพลูต่อการเพิ่มระดับของสารสื่อประสาท Serotonin ในสมองของสัตว์ทดลอง [108]

5.1.3 การติดตาม 5-HT_{1B}R ด้วยวิธี Western blotting technique เนื่องจากยา Sumatriptan เป็นยาในกลุ่ม 5-HT_{1B/1D} agonist ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการรักษาอาการปวดไมเกรน จึงได้ทำการติดตามโปรตีน 5-HT_{1B}R ในสมองของสัตว์ทดลอง โดยพบว่าการแสดงออกของ 5-HT_{1B}R มีขนาด 47 kDa ซึ่งสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับยา Sumatriptan และสารสกัดกานพลูมีขนาดความเข้มและความหนาของ band มากกว่ากลุ่มควบคุม จึงทำให้สามารถยืนยันได้ว่าวิธีการที่ใช้เลียนแบบอาการปวดไมเกรนในสัตว์ทดลองมีความเกี่ยวข้องกับการปวดไมเกรนและสารสกัดกานพลูสามารถออกฤทธิ์บรรเทาอาการปวดไมเกรนในสัตว์ทดลองได้ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสกัดกานพลูอาจออกฤทธิ์เป็น 5-HT_{1B} agonist เช่นเดียวกับยา Sumatriptan ที่เป็นยาบรรเทาอาการปวดไมเกรน

5.1.4 การศึกษาฤทธิ์ในการนอนหลับด้วยวิธี Sleeping time และศึกษาความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อด้วยวิธี Muscle relaxant activity ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากดอกทานตะวันทุกขนาด (250, 500 และ 750 mg/kg/bw) มีฤทธิ์ทำให้เกิดอาการง่วง (Sedation) ทำให้หลับ (Hypnotic) และคลายกล้ามเนื้อ (Muscle relaxation) ซึ่งออกฤทธิ์ไปในทางเดียวกับยา Diazepam ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม Benzodiazepines จะออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง ดังแสดงในภาพที่ 5.6 โดยยาจะจับกับ $GABA_A$ receptors ที่ Benzodiazepines receptor ทำให้ GABA และ $GABA_A$ receptors จับกันได้มากขึ้น และ Cl^- ไหลเข้าเซลล์ประสาทมากขึ้น ทำให้เกิด Hyperpolarization หรือลดการเกิด Depolarization [124] ส่วนกลุ่มสารมาตรฐาน Caffeine ไม่สามารถทำให้หนูทดลองหลับได้ เนื่องจาก Caffeine มีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง (CNS stimulant) และเพิ่มการหลั่งของ Norepinephrine ในสมอง จึงทำให้ระบบประสาทเกิดการตื่นตัว [130, 131] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการคลายกล้ามเนื้อโดยจะจับกับ α_2-GABA_A receptors ที่ปลายประสาท (ด้าน presynaptic membrane) ในไขสันหลัง



ภาพที่ 5.6 กลไกการออกฤทธิ์ของยากกลุ่ม Benzodiazepine และสารสกัดจากดอกทานตะวันต่อการนอนหลับและความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อของสัตว์ทดลอง

5.1.5 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลู พบว่าน้ำมันกานพลูทุกความเข้มข้น (1%, 7.5% และ 15% v/v ในอะซีโตน) และสารสกัดกานพลูทุกขนาดมีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี EPP-induced rat ear edema และ Carrageenan-induced rat paw edema ตามลำดับ โดยออกฤทธิ์ไปทางเดียวกับยามาตรฐาน Phenylbutazone ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม NSAIDs ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารสื่ออักเสบ Prostaglandin ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของกลุ่ม NSAIDs นี้ จะแสดงดังภาพที่ 5.2

ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงการออกฤทธิ์ของน้ำมันและสารสกัดจากดอกกานพลูต่อกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาการปวดไมเกรนและอาการข้างเคียง ได้แก่ ฤทธิ์ผ่อนคลายนอนหลับและด้านการอักเสบ ที่ได้มีการยืนยันทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์จำเพาะเจาะจงต่อการบรรเทาอาการปวดไมเกรนที่มาจากพืชสมุนไพรและในอนาคตสามารถนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยทางคลินิกในมนุษย์ (Clinical trial) ได้นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคของกลุ่มอาการโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ เช่น ฤทธิ์ในการนอนหลับและผ่อนคลายอาจจะนำไปพัฒนาเป็นยานอนหลับเพื่อให้ผู้ที่มีอาการดังกล่าวเกิดการผ่อนคลายและหลับได้ดีขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในอนาคตควรมีการทดสอบความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง (Toxicity) เพื่อดูอาการเป็นพิษที่แสดงออกเมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารทดสอบ

5.2.2 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการดูดซึมของสารสกัดกานพลู

5.2.3 สามารถใช้ข้อมูลจากการวิจัยนี้เป็นแนวทางเพื่อนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดไมเกรน รวมทั้งใช้รักษาโรคของกลุ่มอาการโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้

5.2.4 นำข้อมูลจากการวิจัยไปใช้ในการศึกษาวิจัยทางคลินิกในมนุษย์ (Clinical trial)

บรรณานุกรม

- [1] P.T. Goadsby, R.B. Lipton, and M.D. Ferrari, "Migraine-current understanding and treatment," *The New England Journal of Medicine*, vol. 346, pp. 257-270, Jan 2002.
- [2] A.I. Scher, W.F. Stewart, J. Liberman, and R.B. Lipton, "Prevalence of frequent headache in population sample," *Headache*, vol. 38, pp. 497-506, Jul/Aug 1998.
- [3] J. Castillo, P. Munoz, V. Guitera, and J. Pascual, "Epidemiology of chronic daily headache in the general population," *Headache*, vol. 39, pp. 190-196, Mar 1999.
- [4] M.E. Bigal, R.B. Lipton, and W.F. Stewart, "The epidemiology and impact of migraine," *Current Neurology and Neuroscience Reports*, vol. 4 (2), pp. 98-104, Mar 2004.
- [5] L. Edvinsson, "Blockade of CGRP receptors in the intracranial vasculature : a new target in the treatment of headache," *Cephalalgia*, vol. 24 (8) , pp. 611-622, Aug 2004.
- [6] E. Nagata, J. Hamada, T. Shimizu, M. Shibata, S. Suzuki, T. Osada, R. Takaoka, M. Kuwana, and N. Suzuki, "Altered levels of serotonin in lymphoblasts derived from migraine patients," *Neuroscience Research*, vol. 57 (2), pp. 179-183, Feb 2007.
- [7] A. MaassenVanDenBrink, and K.Y. Chan, "Neurovascular pharmacology of migraine," *European Journal of Pharmacology*, vol. 585 (2-3), pp. 313-319, May 2008.
- [8] S.S. Morey, "Guidelines on migraine : part 5. Recommendations for specific prophylactic drugs," *American Family Physician*, vol. 62, pp. 2535-2539, Dec 2000.
- [9] P. Tfelt-Hansen, "Efficacy of beta-blockers in migraine. A critical review," *Cephalalgia*, vol. 6 (5), pp. 15-24, 1986.
- [10] L. Reveiz-Harault, A.F. Cardona, E.G. Ospina, and P. Carrillo, "Effectiveness of flunarizine in the prophylaxis of migraine : a meta-analytical review of the literature," *Revista de Neurologia*, vol. 36 (10), pp. 907-912, May 2003.
- [11] F. Galletti, L.M. Cupini, I. Corbelli, P. Calabresi, and P. Sarchielli, "Pathophysiological basis of migraine prophylaxis," *Progress in Neurobiology*, vol. 89 (2), pp. 176-192, Oct 2009.
- [12] J. Klapper, "Divalproex sodium in migraine prophylaxis : a dose-controlled study," *Cephalalgia*, vol. 17 (2), pp. 103-108, Apr 1997.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [13] H.C. Diener, J.P. Jansen, A. Reches, J. Pascual, D. Pitei, and T.J. Steiner, "Efficacy tolerability and safety of oral eliptriptan and ergotamine plus caffeine (Cafergot) in the acute treatment of migraine : a multicenter randomized double-blind, placebo-controlled compassion," *European Neurology*, vol. 47 (2), pp. 99-107, 2002.
- [14] สันติ โพธิ์ศรี, "ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด," วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, 2551.
- [15] ปณต ตั้งสุจริต วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ ชุภา คู่คงวิริยพันธุ์ และวันชัย ไอยารัตน์. "การตรวจสอบฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของผักพื้นบ้านอีสาน," *ศรีนครินทร์เวชสาร*, ปีที่ 21 (4), น. 305-310, 2549.
- [16] เสี่ยม พงษ์บุญรอด, *ไม้เทศ เมืองไทย*, กรุงเทพฯ : เกษมบรรณกิจ, 2522.
- [17] C. Ghelardini, N. Galeotti, L. Di CesareMannell, G. Mazzanti, and A. Bartolini, "Local anaesthetic activity of β -caryophyllene," *II Farmaco*, vol. 56 (5-7), pp. 387-389, May-Jul 2001.
- [18] J. Briozzo, "Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 66 (1), pp. 69-75, Jan 1989.
- [19] S. Roengsumran, A. Petsom, S. Thanniyavarn, S. Pornpakakul, and S. Khantahiran, "Antibacterial Activity of Some Essential Oils," *Journal of Scientific Research Chulalongkorn University*, vol. 9, pp. 13-19, 1997.
- [20] A. Ebadollahi, "Essential Oils Isolated from Myrtaceae Family as Natural Insecticides," *Annual Review & Research in Biology*, vol. 3 (3), pp. 148-175, Jul-Sep 2013.
- [21] Y. Tanko, A. Mohammed, M.A. Okasha, A.H. Umar, and R.A. Magaji, "Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of ethanol extract of *Syzygium aromaticum* flower bud in Wistar rats and mice," *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, vol. 5 (2), pp. 209-212, Jan 2008.
- [22] M.J. Marmura, and S.D. Silberstein, "Current understanding and treatment of headache disorder : Five new things," *Neurology*, vol. 76, pp. 31-36, Feb 2011.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [23] D. Pietrobon, and J. Striessnig, "Neurobiology of migraine," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 4, pp. 386-398, May 2003.
- [24] R.C. Peatfield, M.J. Gewel, and F.C. Rose, "Asymmetry of the aura and pain in migraine," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 44 (9), pp. 846-848, Sep 1981.
- [25] B.W. Somerville, "The role of progesterone in menstrual migraine." *Neurology*, vol. 21, pp. 853-859, Aug 1971.
- [26] B.W. Somerville, "The role of estradiol withdrawal in the etiology of menstrual migraine," *Neurology*, vol. 22, pp. 355-365, Apr 1972.
- [27] Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society, "The international classification of headache disorders : 2 nd ed. (ICHD-II)," *Cephalalgia*, vol. 24, pp. 9-160, 2004.
- [28] D.K. Arulmozhi, A. Veeranjanyula, and S.L. Bodhanker, "Migraine : current concepts and emerging therapies," *Vascular Pharmacology*, vol. 43 (3), pp. 176-187, Sep 2005.
- [29] D. Pietrobon, "Migraine : new molecular mechanisms," *Neuroscientist*, vol. 11 (4), pp. 373-386, Aug 2005.
- [30] M.A. Moskowitz, "Genes, proteases, cortical spreading depression and migraine : impact on pathophysiology and treatment," *Functional Neurology*, vol. 22 (3), pp. 133-136, Jul-Sep 2007.
- [31] R.K. Cady, C.P. Schreiber, and K.U. Farmer, "Understanding the Patient With Migraine : The Evolution From Episodic Headache to Chronic Neurologic Disease. A Proposed Classification of Patients With Headache," *Headache*. vol. 44 (5), pp. 426-435, May 2004.
- [32] A. West, and S. Sanders, "What Causes Migraines?," in *Managing Migraine : How to prevent and Control Migraine Headaches*. USA : Conrad & Associates, pp. 11-15, 2006.
- [33] A. Mauskop, D. Dodick, F.G. Freitag, and E. Loder, "Criteria for Considering Migraine Prophylaxis," in *Advances in Migraine Prophylaxis : Current State of the Art and Future Prospects*. Chicago : National Headache Foundation, pp. 2-6, 2001.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [34] S. Holland, S.D. Silberstein, F. Freitag, D.W. Dodick, C. Argoff, and E. Ashman, "Evidence-based guideline update : NSAIDs and other complementary treatments for episodic migraine prevention in adults," *Neurology*, vol. 78, pp. 1346-1353, Apr 2012.
- [35] P. Tfelt-Hansen, P.R. Saxena, C. Dohlof, J. Pascual, M. Lainez, P. Henry, H.-C. Diener, J. Schoenen, M.D. Ferrari, and P.J. Goadsby, "Ergotamine in the acute treatment of migraine : A review and European consensus," *Brain*, vol. 123, pp. 9-18, 2000.
- [36] J.R. Graham, and H.G. Wolff, "Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate," *Archives of Neurology & Psychiatry*, vol. 39 (4), pp. 737-763, Apr 1938.
- [37] E. Loder, "Triptan Therapy in Migraine," *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, pp. 63-70, Jul 2010.
- [38] S.J. Tepper, A.M. Rapoport, and F.D. Sheftell, "Mechanisms of Action of the 5-HT_{1B/1D} Receptor Agonist," *American Medical Association*, vol. 59 (7), pp. 1084-1088, Jul 2002.
- [39] D.E. Nichols, and C.D. Nuchols, "Serotonin Receptors," *Chemical Reviews*, vol. 108, pp. 1614-1641, Oct 2008.
- [40] D. Hoyer, D.E. Clarke, J.R. Fozard, P.R. Hartig, G.R. Martin, E.J. Mylecharane, P.R. Saxena, and P.P.A. Humphrey, "VII. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin)," *Pharmacological Reviews*, vol. 46 (2), pp. 157-203, 1994.
- [41] C. Wilcox, "Nutrition Wonderland, Understanding Our Bodies : Serotonin, The connection Between Food and Mood," *Nutrition Wonderland*, July 2009.
- [42] IASP, "Part III : Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage," *Classification of Chronic Pain*, pp. 209-214, 1994.
- [43] อำนวย ธิฐาพันธ์, *Faculty of Medical Ramathibodi Hospital (online)*, 2010, Available: <http://ramacme.ra.mahidol.ac.th/th/?q=node/15> (27 กันยายน 2555).
- [44] B. Kozier, G. Erb, and A.J. Berman, *Fundamentals of nursing : Concepts, process, and practice*, 6 th ed. New Jersey : Prentice-Hall, Inc., 2000.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [45] J.M. Black, and Matassarini-Jacobs, "Pain," in E.M. Jacob (Ed.), *Medical-surgical nursing : Clinical management for continuity of care*, 15 th ed. Philadelphia : W.B. Saunders., pp. 341-396, 1997.
- [46] M.E.A. Laskin, "Pain management," in L. White, and G. Duncan (Eds.), *Medical-surgical nursing : An integrated approach*, 2 nd ed. Australia : Delmar., pp. 281-305, 2002.
- [47] B.A. Coda, and J.J. Bonica, "General considerations of acute pain," in J.D. Loeser (Ed.), *Bonica's management of pain*, 3 rd ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins., pp. 222-240, 2001.
- [48] A. Keane, E.M. McMenamim, and R.C. Polomano. "Pain : The fifth vital sign," in D.D. Ignatavicius, and M.L. Workman (Eds.), *Medical-surgical nursing*, 4 th ed. Philadelphia : W.B. Saunders., pp. 61-94, 2002.
- [49] CHANGE PAIN, *Change pain (online)*, 2009, Available: http://www.change-pain.com/grt-change-pain-portal/GRT-CHANGE-PAIN-PORTAL_Home/Picture_Library/20360066.jsp (10 พฤษภาคม 2557).
- [50] L. Ferrero-Miliani, O.H. Nielsen, P.S. Andersen, and S.E. Girardin, "Chronic inflammation : importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 147, pp. 227-235, 2006.
- [51] G.B. Ryan, and G. Majno, "Acute Inflammation," *American Journal of Pathology*, vol. 86 (1), pp. 185-276, Jan 1977.
- [52] V. Kumar, A.K. Abbas, and J.C. Aster "Chronic Inflammation," in *Robbins Basic Pathology*, 9 th ed. Canada : Elsevier, Inc., 2013.
- [53] C.A. Dinarello, "Anti-inflammatory Agents : Present and Future," *Cell*, vol. 140, pp. 935-950, Mar 2010.
- [54] H.U. Zeilhofer, "Prostanoids in nociception and pain," *Biochemical Pharmacology*, vol. 73, pp. 165-174, 2007.
- [55] E. Ricciotti, and G.A. FitzGerald, "Prostaglandins and Inflammation," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, pp. 986-1000, 2011.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [56] J. Balsinde, M.V. Winstead, and E.A. Dennis, "Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization," *Federation of European Biochemical Societies*, vol. 531, pp. 2-6, Sep 2002.
- [57] G.E. Caughey, L.G. Cleland, P.S. Penglis, J.R. Gamble, and M.J. James, "Roles of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Prostanoid Production by Human Endothelial Cell : Selective Up-Regulation of Prostacyclin Synthesis by COX-2," *The Journal of Immunology*, vol. 167, pp. 2831-2838, 2001.
- [58] F. Guiliano, and T.D. Warner, "Origins of Prostaglandin E₂ : Involvements of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Human and Rat Systems," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 303 (3). pp. 1001-1006, Aug 2002.
- [59] B. Kozier, G. Erb, A. Berman, and S. Snyder. (2004). **Fundamental of nursing: Human health and function** (4th ed). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- [60] อินทิรา ป่ากันทะ, "ปัญหาการนอนหลับและวิธีการแก้ไข," *วารสารพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*, 1 (2), น. 31-38, กรกฎาคม 2550.
- [61] วรกต สุวรรณสถิตย์, "การตรวจการนอนหลับในโรงพยาบาลรามาชิดี," *รามาชิดีพยาบาลสาร*, 9 (2), น. 111-123, 2546.
- [62] วรภา แผลมเพ็ชร์, "การนอนหลับและปัจจัยรบกวนการนอนหลับของผู้ป่วยสูงอายุที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลแผนกอายุรกรรม," *วิทยานิพนธ์ปริญญาพยาบาลศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาการพยาบาลผู้ใหญ่, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา, ประเทศไทย, 2544.*
- [63] สุดประนอม สมันตเวทิน. (2547). *พยาธิสรีรวิทยาสำหรับการพยาบาล* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: วิทยาลัยพยาบาลสภากาชาดไทย.
- [64] ศูนย์รวมข้อมูลสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย, *Thai Biodiversity (Online)*, Available: <http://www.thai-biodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=30969> (17 พฤษภาคม 2557).
- [65] C.A. Backer, and R.C. Bakhuizen Van Den Brink, in *Flora of Java*. Netherlands : Groningen., pp. 337-342, 1968.
- [66] โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช, *กานพลู (Online)*, 2013, Available: http://www.biogang.net/biodiversity_view.php?menu=biodiversity&uid=19992&id=127222 (5 March 2014).

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [67] Praithaiherb, *กานพลู (Online)*, 2006, Available: <http://prraithaiherb.com/page3.html> (24 August 2011).
- [68] บ้านสวนพอเพียง, *กานพลู (Online)*, 2008, Available: <http://www.bansuanporpeang.com/node/24907> (24 August 2011).
- [69] ภัศรา ชวนประดิษฐ์, *กานพลู (Online)*, 2008, Available: http://www.agriman.doae.go.th/home/news3/news3_1/.../0005kanplu.doc (24 August 2011).
- [70] ประเทืองศรี สิ้นชัยศรี. “การผลิตสมุนไพรและเครื่องเทศ,” กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545.
- [71] D. Bhowmik, K.P.S. Kumar, A. Yadav, S. Srivastava, S. Paswan, and A.S. Dutta, “Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits,” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 1 (1), pp. 13-23, 2012.
- [72] M.I. Nassar, A.H. Gaara, A.H. El-Ghorab, A.H. Farrag, H. Shen, E. Huq, and T.J. Mabry, “Chemical constituents of clove (*Syzygium aromaticum*, Fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity,” *Revista Latinoamericana de Quimica*, vol. 35 (3), pp. 45-57, 2007.
- [73] V.K. Raina, S.K. Srivastava, K.K. Aggarwal, K.V. Syamasundar, and S. Kumar, “Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India,” *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 16, pp. 334-336, Sep-Oct 2001.
- [74] K.G. Lee, and T. Shibamoto, “Antioxidant properties of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry],” *Food Chemistry*, vol. 74 (4), pp. 443-448, Sep 2001.
- [75] H. Alma, E. Murat, S. Nitz, and H. Kollmannsberger, “Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.),” *BioResources*, vol. 2 (2), pp. 265-269, 2007.
- [76] R. Banker, A. Kumer, and S. Puri, “Phytochemical constituent of *Syzygium aromaticum* L.,” *International Journal of Current Research*, vol. 3 (7), pp. 215-217, Jul 2011.
- [77] ยุวดี จอมพิทักษ์, *รักษาโรคด้วยสมุนไพร*, กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ห่อสมุดกลาง, 2541.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [78] M. Hongbao, S. Kuan-Jiunn, and L. Sheau-Long, "Study of ELISA Technique," *Nature and Science*, vol. 4 (2), pp. 36-37, 2006.
- [79] M.L. Rudolf, "Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)," *Clinical Chemistry*, vol. 51 (12), pp. 2415-2418, 2005.
- [90] D.G. Stephanie, and R.P. Kruti, "Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, pp. 1-3, 2013.
- [91] A. Voller, A. Bartlett, and D.E. Bidwell, "Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 31, pp. 507-520, 1978.
- [92] Abnova, *ELSA (online)*, 2015, Available: <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7B70196CA1-59B1-40D0-8394-19F533EB108F%7D> (2 March 2015).
- [93] J. Young, and M. Hongbao, "Practical Technique of Western blotting," *The Journal of American Science*, vol. 4 (2), pp. 1-3, 2008.
- [94] M. Hongbao, "Western Blotting Method," *The Journal of American Science*, vol. 2 (2), pp. 23-27, 2006.
- [95] A. Penna, and M. Cahalan, "Western Blotting Using the Invitrogen NuPage Novex Bis Tris MiniGels," *Journal of Visualized Experiments*, pp. 1-3, 2007.
- [96] Leinco Technologies, *General Western Blot Protocol (online)*, 2006, Available: http://www.leinco.com/general_wb (2 March 2015).
- [97] M.M. Hoque, M.L. Bari, V.K. Juneja, and S. Kawamoto, "Antimicrobial Activity of Cloves and Cinnamon Extracts against Food Borne Pathogens and Spoilage bacteria, and Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Ground Chicken meat with their Essential oils," *Republic National Food Research Institute*, vol. 72, pp. 9-21, 2008.
- [98] S. Thirach, K. Tragoolpua, S. Punjaisee, C. Khamwan, C. Jatisatienr, and N. Kunyanone, "Antifungal Activity of Some Medicinal Plant Extracts Against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*," *Acta Horticulture*, vol. 597, pp. 217-221, 2003.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [99] A.N. Daniel, S.M. Sartoretto, G. Schmidt, S.M. Caparroz-Assef, C.A. Bersani-Amado, and R.K.N. Cuman, "Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19 (1), pp. 212-217, Jan-Mar 2008.
- [100] M. Hosseini, M. Kamkar-Asl, and H. Rakhshandeh, "Analgesic effect of clove essential oil in mice," *Avicenna Journal of Phytomedicine*, vol. 1 (1), pp. 1-6, Apr 2011.
- [101] S.E.M. Shalaby, M.M. El-Din, S.A. Abo-Donia, M. Mettwally, and Z.A. Attia, "Toxicological Affects of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* and Clove *Eugenia caryophyllus* on Albino Rats," *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 20 (2), pp. 429-434, Mar 2011.
- [102] ชีราพร อนันตะเศรษฐกุล, "ภาวะไวต่อไนตริกออกไซด์จากการพร่องซีโรโตนินของระบบไทรเจมิโนวาสคูลาร์ในหนูแร้ท : สมมติฐานของพยาธิกำเนิดโรคไมเกรน," วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต, สาขาวิชาสรีรวิทยา, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย, 2541.
- [103] N.E.J. Berman, V. Puri, S. Chandrala, S. Puri, R. Macgregor, C.S. Liverman, and R.M. Klein, "Serotonin in Trigeminal Ganglia of Female Rodents : Relevance to Menstrual Migraine," *Headache*, pp. 1230-1245, 2006.
- [104] Q. Ye, L-Y. Yan, L-J. Xue, Q. Wang, Z-K. Zhou, H. Xiao, and Q. Wan, "Flunarizine blocks voltage-gated Na^+ and Ca^+ currents in cultured rat cortical neurons : A possible locus of action in the prevention of migraine," *Neuroscience Letters*, vol. 487 (3) , pp. 394-399, Jan 2011.
- [105] E.A. Jennings, R.M. Ryan, and M.J. Christie, "Effects of sumatriptan on rat medullary dorsal horn neurons," *Pain*, vol. 111, pp. 30-37, May 2004.
- [106] J. Liang, X. Lui, J. Zheng, and S. Yu, "Effect of amitriptyline on tetrodotoxin-resistant Na_v 1.9 currents in nociceptive trigeminal neurons," *Molecular Pain*, vol. 9 (31), pp. 1-10, Jun 2013.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [107] D.R. Loyd, P.B. Chen, and K.M. Hargreaves, "Antihyperalgesic Effects of Anti-Serotonergic Compounds on Serotonin-and Capsaicin-evoked Thermal Hyperalgesia in the Rats," *Neuroscience*, vol. 203, pp. 207-215, Feb 2012.
- [108] X. Wu, M. Zhang, and H. Huang, "Effect of Qilongtutong granule on calcitonin gene-related peptide, beta-endorphin, serotonin, dopamine, and noradrenalin in migraine model rats and mice," *Journal of Traditional Chinese Medicine*, vol. 34 (2), pp.188-193, Apr 2014.
- [109] C.R. Correa, D.J. Kyle, S. Chakraverty, and J.B. Calixto, "Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice," *British Journal of Pharmacology*, vol. 117 (3), pp. 552-558, Feb 1996.
- [110] Y. Kolesnikov, and G.W. Pasternak, "Topical opioids in mice : analgesia and reversal of tolerance by a topical N-methyl-D-aspartate antagonist," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 290, pp. 247-252, Feb 1999.
- [111] W.F. Mathes, and R.B. Kanarek, "Persistant exercise attenuates nicotine-but not clonidine-induced antinociception in female rats," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 85 (4), pp. 762-768, Dec 2006.
- [112] D.R. Helton, J.P. Tizzano, J.A. Monn, D.D. Schoepp, and M.J. Kallman, "Anxiolytic and Side-Effect Profile of LY354740 : A Potent, Highly Selective, Orally Active Agonist for Group II Metabotropic Glutamate Receptors," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 284 (2), pp. 651-660, Feb 1998.
- [113] R. Tsuji, N. Isobe, and H. Kawasaki, "Mechanism of prolongation of pentobarbital-induced sleeping time by empenthrin in mice," *Toxicology*, vol. 108, pp. 185-190, 1996.
- [114] A. Zia, B.S. Siddiqui, S. Begum, S. Siddiqui, and A. Suria, "Studies on the constituents of the leaves of *Nerium olender* on behavior pattern in mice," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 49, pp. 33-39, 1995.
- [115] C.A. Dunstan, Y. Noreen, G. Serrano, P.A. Cox, P. Perera, and L. Bohlin, "Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 57 (1), pp. 35-56, Jun 1997.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [116] G.B. Fregnan, and A.L. Torsello, "Topical Anti-Inflammatory Activity of Dexamethasone 17-Valerate and Other Corticosteroids," *Current Therapeutic Research*, vol. 17 (4), pp. 375-381, Apr 1975.
- [117] D. Muck-Seler, and M. Diksic, "The acute effects of reserpine and NSD-1015 on the brain serotonin synthesis rate measured by an autoradiographic method," *Neuropsychopharmacology*, vol. 12 (3), pp. 251-262, 1995.
- [118] A.M. Harriott, and M.S. Gold, "Serotonin 1D receptors (5HT_{1D}R) are differentially distributed in nerve fibres innervating craniofacial tissues," *Cephalalgia*, vol. 28 (9), pp. 933-944, September 2008.
- [119] life technologies, *iBlot[®] Dry Blotting System (online)*, 2015, Available: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/iblotsystem_qrc.pdf (5 March 2015).
- [120] life technologies, *iBlot[®] Transfer Stack, nitrocellulose, mini (online)*, 2015, Available: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/IB301032> (5 March 2015).
- [121] S.A. Guenette, F. Beaudry, J.F. Marier, and P. Vachon, "Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats," *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 29, pp. 265-270, 2006.
- [122] W. Li, R. Tsubouchi, S. Qiao, M. Haneda, K. Murakami, and M. Yoshino, "Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages," *Biomed Research*, vol. 27, pp. 69-74, 2006.
- [123] J.F. Sobanko, C.J. Miller, and T.S. Alster, "Topical Anesthetics for Dermatologic Procedures: A Review," *Dermatologic Surgery*, pp. 1-13, 2012.
- [124] ณัฐวุฒิ สิทธิหมู่. (2555). *เภสัชวิทยา: เนื้อหาและแบบฝึกหัด*. กรุงเทพฯ: โอเอสดีที พับลิชชิ่ง.
- [125] P. Chul-Kyu, K. Kihwan, J. Sung Jun, K. Min Ji, A. Dong Kuk, H. Seong-Doo, K. Joong Soo, and O. Seog Bae, "Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system," *Pain[®]*, vol. 144, pp. 84-94, 2009.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [127] A. Szallasi, and P.M. Blumberg, "Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanism," *Pharmacological Reviews*. vol. 51 (2), pp. 159-211, 1999.
- [128] Z.H. Lou, Y.F. Huang, G.Y. Lv, and F.Yu, "Influence of Tianma Gouteng granule on migraine mouse induced by reserpine," *Zhong Hua Zhong Yi Yao Za Zhi*. vol. 27 (5), pp. 1412-1415, 2012.
- [129] S.D. Silberstein, "Migraine: preventive treatment," *Current Medical Research and Opinion*. vol. 17 (1), pp. 2001, 2001.
- [130] K. Silverman, S.M. Evans, E.C. Strain, and R.R. Griffith, "Withdrawal syndrome after the double-blind cessation, caffeine consumption," *The New England Journal of Medicine*, vol. 327, pp. 1109-1114, 1999.
- [131] O.J. Owolabi, F.C. Amaechina, and A.B. Eledan, "Central nervous system stimulant effect of the ethanolic extract of *Kigelia Africana*," *Journal of Medicinal Plants Research*. vol. 2 (2), pp. 20-23, 2008.
- [132] C. Qing-Ping, W. Ei-En, C. Xiang-Yu, F. Hong-Zheng, L. Zhi-Bin, L. Shu-Qian, and Z. Yong-He, "Extract of *Ganoderma lucidum* potentiates pentobarbital-induced sleep via a GABAergic mechanism," *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. vol. 86, pp. 693-698, February 2007.
- [133] R.P. Carlson, L.O'Neill-Davis, J. Chang, and A.J. Lewis, "Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents," *Agents Actions*, vol. 17, pp. 197-204, 1985.
- [134] J. Necas, and L. Bartosikova, "Carrageenan: a review," *Veterinari Medicina*. vol. 58 (4), pp. 187-205, 2013.
- [135] พยงค์ เทพอักษร, (2553). *เภสัชวิทยา เล่ม 2*. กรุงเทพฯ: ชนาพรส จำกัด.
- [136] M.K. Chung, A.D. Guler, and M.J. Caterina, "TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation," *Nature Neuroscience*. vol. 11, pp. 555-564, April 2008.
- [137] B.G. Katzung, "Sedative-hypnotic drugs," in *Basic and clinical pharmacology*. USA: The McGraw Hill Companies, Inc, pp.364-381, 2001.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย





ภาพที่ 1ก เครื่องกลั่นด้วยน้ำ (Hydro-distillation)



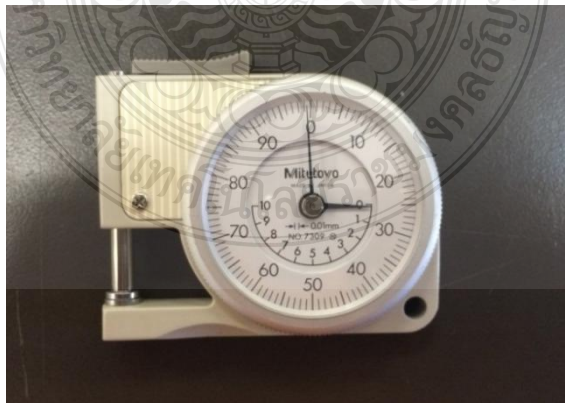
ภาพที่ 2ก เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator)



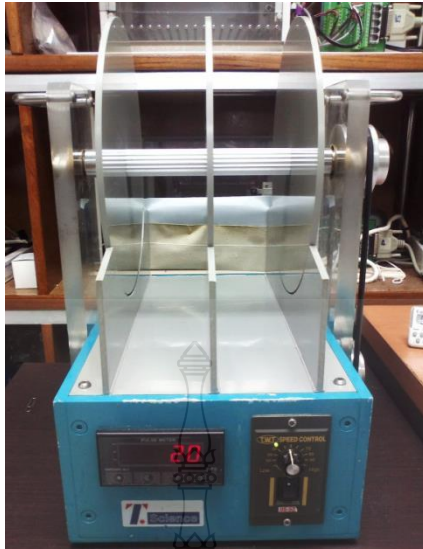
ภาพที่ 3ก เครื่อง Tail flick meter



ภาพที่ 4ก อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์บรรเทาอาการปวดด้วยวิธี Hot plate test



ภาพที่ 5ก Pocket thickness gauge



ภาพที่ 6ก เครื่อง Rota rod



ภาพที่ 7ก เครื่อง Plethysmometer



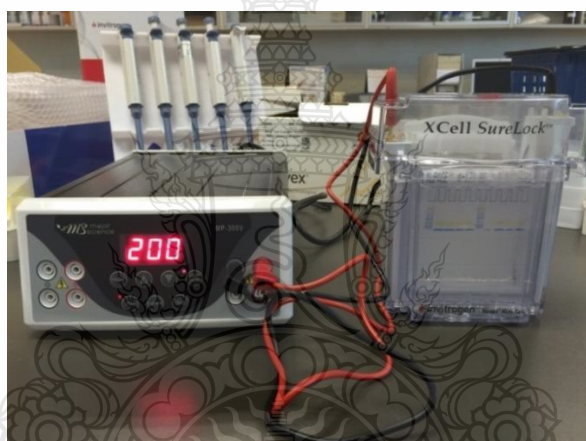
ภาพที่ 8ก อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ ELISA



ภาพที่ 9ก เครื่อง Microplate reader



ภาพที่ 10ก อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ Western blotting



ภาพที่ 11ก ชุด Gel Electrophoresis XCell SureLock™ Mini-Cell



ภาพที่ 12ก ชุด iBlot™ Gel Transfer Device

ภาคผนวก ข
การเตรียมสั้วทดลองเพื่อใช้ในการวิจัย





(ก)



(ข)



(ค)

- ภาพที่ 1ข** การเลี้ยงและดูแลหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rat
- ก. ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง
 - ข. หนูในกรงเลี้ยง
 - ค. หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rat



(ก)

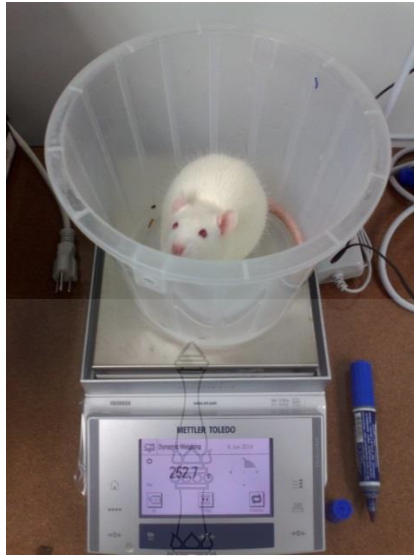


(ข)



(ค)

- ภาพที่ 2 ข การเลี้ยงและดูแลหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ ICR Mouse
- ก. ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง
 - ข. หนูในกรงเลี้ยง
 - ค. หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ ICR Mouse



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3 ข การชั่งน้ำหนักหนู Rat และ หนู Mice



ภาคผนวก ค

การเตรียมสารทดสอบและบัฟเฟอร์

1. การเตรียมสารสกัดให้อยู่ในรูปสารละลายเพื่อใช้ป้อนให้กับสัตว์ทดลอง

1.1 คำนวณหาขนาด (Dose) ของสารที่ต้องการป้อนให้กับสัตว์ทดลอง

ตัวอย่างการคำนวณ เช่น ต้องการเตรียม dose 250 mg/kg

ถ้าหนูหนัก 1000 g

สาร 250 mg

ถ้าหนูหนัก x g

$$\text{จะมีสาร} = \frac{250x}{1000} = \frac{x}{4} \text{ mg}$$

ถ้าต้องการเตรียมความเข้มข้น 75 mg/ml

ปริมาณสาร 75 mg

ในน้ำกลั่น 1 ml

ปริมาณสาร $\frac{x}{4}$ mg

ในน้ำกลั่น $\frac{1}{75} \times \frac{x}{4} = \frac{x}{300}$ (Factor)

ถ้าหนูหนัก 250 g จะได้สาร = $\frac{250}{300} = 0.84$ ml

1.2 คำนวณหาปริมาณทั้งหมดของสาร และปริมาณที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับป้อนให้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม เช่น ในหนู Rat ควรป้อนไม่เกิน 2.5 ml และในหนู Mice ควรป้อนไม่เกิน 1 ml ตัวอย่างการคำนวณ เช่น

ถ้าหนูหนัก 250 g จะได้สาร 0.84 g เตรียมสำหรับป้อนให้หนู 6 ตัว จะต้องใช้สารทั้งหมด = $0.84 \text{ ml} \times 6 \text{ ตัว} = 5.04 \text{ ml}$ (แต่ต้องมีการเตรียมประมาณ 8 ml เนื่องจากให้ห่างต่อการดูแลเพื่อป้อนให้กับสัตว์ทดลอง) เป็นต้น

1.3 คำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม

ตัวอย่างการคำนวณ เช่น เตรียมความเข้มข้น 75 mg/ml ปริมาตร 8 ml

สารละลายปริมาตร 1 ml ต้องชั่งสาร 75 mg

ถ้าต้องการเตรียม 8 ml ต้องชั่งสาร = $8 \times 75 = 600$ mg (0.6 g)

Acacia 5% w/v

สารละลายปริมาตร 100 ml จะมี Acacia 5 g

ถ้าต้องการเตรียม 8 ml จะมี Acacia = $\frac{8 \times 5}{100} = \frac{40}{100} = 0.4$ g

ดังนั้น ต้องชั่งสาร 0.6 g ละลายในน้ำกลั่น 8 ml ที่เติม Acacia 0.4 g

1.4 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัด

1.4.1 ชั่งสารสกัดปริมาณที่ต้องการ

1.4.2 ชั่ง Acacia ที่ต้องมีการเติม Acacia เนื่องจากยาหรือสารสกัดบางชนิดไม่สามารถละลายในน้ำได้ จึงต้องมีการใช้ Acacia ที่มีคุณสมบัติทำให้สารละลายเข้ากันได้ดี และเป็นเนื้อเดียวกัน โดยจะค่อยๆ พองตัว ทำให้สารอยู่ในรูปแขวนลอย ซึ่งความเข้มข้นของ Acacia ที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดสารสกัด เช่น หากสารสกัดนั้นละลายได้ง่ายก็จะใช้ปริมาณ Acacia น้อย เป็นต้น



ภาพที่ 1ค ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ป้อนให้สัตว์ทดลอง

2. สูตรการเตรียม Wetting compound

Wetting compound เป็นสารละลายที่ใช้กับเครื่อง Plethysmometer ใช้วัดปริมาตรของอู้งเท้าหนู (Paw volume) โดยมีสูตรการเตรียมดังนี้

- Teepol	1 ml
- NaCl	0.5 g
- น้ำกลั่น (Distilled water)	1 L

ขั้นตอนการเตรียม

- 1.1 ชั่งหรือตวงสารชนิดต่างๆ ตามปริมาณที่กำหนดไว้ในขวดที่ต้องการเตรียม
- 1.2 เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบตามที่ต้องการ
- 1.3 นำสารที่ผสมกันเสร็จแล้วไปปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer

3. การเตรียม Carrageenan 1% w/v

Carrageenan 1 % w/v ซึ่งจะละลายใน Normal saline solution (NSS) เตรียมเพื่อใช้ฉีดเข้าที่อู้งเท้าหลังของสัตว์ทดลองตัวละ 0.1 ml ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี Rat paw edema เพื่อเหนี่ยวนำให้อู้งเท้าเกิดการอักเสบ โดยมีการคำนวณและการเตรียม ดังนี้

ขั้นตอนการเตรียม

3.1 การคำนวณ

NSS 100 ml	จะใช้ Carrageenan 1 g
ถ้าต้องการเตรียม 8 ml	จะใช้ Carrageenan = $\frac{8}{100} = 0.08$ g
ดังนั้น ต้องชั่ง Carrageenan 0.08 g	ละลายใน NSS 8 ml

3.2 ชั่งหรือตวงสารชนิดต่างๆ ตามปริมาณที่กำหนดไว้ในขวดที่ต้องการเตรียมให้ครบปริมาตรที่ต้องการ

3.3 นำสารที่ผสมกันเสร็จแล้วไปปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer

*หมายเหตุ

การเตรียม Carrageenan ควรเตรียมก่อนวันทำการทดลอง 1 วัน โดยปั่นทิ้งไว้เพื่อให้ฟองตัวได้ดีและเต็มที (ยิ่งฟองตัวเต็มที่ ยิ่งมีประสิทธิภาพในการเป็น inducer) และเมื่อปั่นเรียบร้อยแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียม Ethyl phenylpropiolate (EPP) 5% v/v

เตรียมโดยละลายใน Acetone

5. การเตรียม Serotonin 0.1 nmol/ μ l

เตรียมเป็น Stock solution ความเข้มข้น 10 nmol/ μ l โดยละลายใน HPLC grade water และนำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.1 nmol/ μ l

6. การเตรียม Capsaicin 3 nmol/50 μ l

เตรียมเป็น Stock solution ความเข้มข้น 60 nmol/ μ l โดยละลายใน Ethanol 95% และนำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 3 nmol/50 μ l และให้ได้ความเข้มข้นของ ethanol <0.5%

7. การเตรียม Reserpine

เตรียมที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml โดยละลายใน normal saline solution (NSS)

8. สูตรการเตรียม 1X MES buffer

- 20X MES buffer 25 ml
- HPLC grade water 475 ml

9. สูตรการเตรียม Washing buffer

- 0.02 M Tris HCl pH 7.6
- NaCl 9 g/L
- Tween 1 ml/L

10. สูตรการเตรียม Skim milk

- Skim milk 5% w/v ใน Washing buffer

11. สูตรการเตรียม Equilibrate buffer

- 1.5 M Tris HCl pH 9.5

12. สูตรการเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเข้มข้น 1M, 1X, 1N

PBS มีสูตรการเตรียม ดังนี้

- Sodium Chloride (NaCl)	8 g
- Potassium Chloride (KCl)	0.2 g
- Sodium Hydrogen Phosphate (Na_2HPO_4)	1.44 g
- Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)	0.24 g
- Distilled water	1 L

ขั้นตอนการเตรียม

- 4.1 ชั่งหรือตวงสารชนิดต่างๆ ตามปริมาณที่กำหนดไว้ในขวดที่ต้องการเตรียม
- 4.2 ผสมน้ำกลั่นประมาณ 300 ml และปรับ pH ให้ได้ 7.4
- 4.3 เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบตามที่ต้องการ
- 4.4 นำสารที่ผสมกันเสร็จแล้วไปปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer

การนำไปใช้

- ความเข้มข้นที่ใช้จริงคือ 0.1 M มีวิธีการเตรียม ดังนี้
 - คูด PBS จากความเข้มข้น 1 M มา 100 ml และเติมน้ำกลั่น 900 ml
 - นำสารที่ผสมกันเสร็จแล้วไปปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer

13. สูตรการเตรียม Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) buffer pH 7.4

- 50 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 0.1% Triton X-100
- 0.1% Sodium dodecyl sulphate (SDS)
- Protease inhibitor

14. การเตรียม Primary antibody

เตรียม Primary antibody (Anti-5HT1B receptor antibody) 2 $\mu\text{g/ml}$ หรือ 1:500 จาก Stock ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (500 $\mu\text{g/ml}$) โดยเตรียมใน Washing buffer โดยมีวิธีการคำนวณ ดังนี้

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(0.5 \times 10^{-3}) V_1 = (2 \times 10^{-6}) \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{(2 \times 10^{-6}) \times 10 \text{ ml}}{(0.5 \times 10^{-3})}$$

$$= \frac{20 \times 10^{-3}}{0.5}$$

$$= 40 \times 10^{-3}$$

$$= 0.0040 \text{ ml}$$

$$= 4 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ใช้ Primary antibody 4 μl ผสมกับ Washing buffer ให้ได้ปริมาตรรวม 10 ml จากนั้นเติม Primary antibody ให้ท่วมแผ่น Membrane เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวกัญชารัตน์ ศึกษากิจ

วัน เดือน ปีเกิด 13 มีนาคม 2532

ที่อยู่ 60/1 หมู่ 5 ตำบลหาดอาษา อำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท 17150

การศึกษา ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ประสบการณ์การทำงาน นักศึกษาปริญญาโท โครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก ระหว่างสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กับสถาบันการศึกษา และผู้ช่วยนักวิจัย ฝ่ายเกษตรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พ.ศ. 2555 ถึง 2558

เบอร์โทรศัพท์ 08-9958-2531

อีเมล b_sueksakit@hotmail.com

