



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง

(The Study of Analgesic Activity of the Extract from *Allium ascalonicum*)

คณะผู้วิจัย

นางสาวนุศติยา วีระวัธนชัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
นางสาวระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2554 และ 2555

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ในโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคล และหน่วยงานต่อไปนี้ที่มีส่วนร่วมให้ความช่วยเหลือ จนโครงการวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. บังอร ศรีพานิชกุลชัย ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพรและคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งและกรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา คณบดี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่อนุญาตให้คณะผู้วิจัยได้ใช้เครื่องมือ สถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีและห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคณาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่มีส่วนช่วยเหลือให้ข้อคิดที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ National Research Council of Thailand-Japan Society for the Promotion of Science (NRCT-JSPS) joint research program ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัยระยะสั้น ณ ประเทศญี่ปุ่น Effect of Shallot Extract on the Expression of Inflammatory Mediators, iNOS and COX-2

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2554-2555 ในการทำวิจัย

| | |
|----------------------|---|
| รายงานการวิจัยเรื่อง | การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดง |
| หัวหน้าโครงการวิจัย | นางสาวนุศติยา วีระวันชัย |
| ผู้ร่วมโครงการวิจัย | นางสาวระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ |
| ปีงบประมาณ | 2555 |
| คำสำคัญ | หอมแดง กระเทียม ฤทธิ์ระงับปวด ฤทธิ์ต้านอักเสบ iNOS COX-2 COX-1 TNF- α IL-1 β IL-6 ปริมาณสารฟีนอลรวม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม |

บทคัดย่อ

หอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) และกระเทียม (*Allium sativum* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันดีและถูกใช้อย่างแพร่หลาย การศึกษาครั้งนี้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนหัวของหอมแดงและส่วนหัวของกระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและกระเทียม ในหนูถีบจักรเพศผู้พันธุ์ ICR ด้วยวิธี Hot-plate และ tail-flick จับเวลาที่หนูสามารถทนอยู่บนแผ่นร้อนหรือเวลาที่หนูทนต่อความร้อนได้โดยไม่กระดกหาง ก่อนให้สารทดสอบในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ น้ำเกลือ (10 มล./กก. ทางช่องท้อง) มอร์ฟีน (10 มก./กก. ทางช่องท้อง) สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมขนาด 100-1200 มก./กก. ทางช่องท้อง หลังให้สารทดสอบ ทำการจับเวลาที่หนูสามารถทนอยู่บนแผ่นร้อนหรือเวลาที่หนูทนต่อความร้อนได้โดยไม่กระดกหางที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 นาที คำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สูงสุดที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้ (% maximum possible effect, %MPE) แล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง %MPE และเวลา พบว่า สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมทุกขนาดที่ใช้ในการทดสอบไม่มีฤทธิ์ระงับปวด การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ด้วยสาร *E. coli* Lipopolysaccharide ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มก./มล. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทำการวัดปริมาณยีนที่แสดงออกด้วย reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่า สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมมีฤทธิ์

ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น สารสกัดกระเทียมยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 และ COX-1 ในขณะที่สารสกัดหอมแดงยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 และไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน COX-2 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมน่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS เอนไซม์ cyclooxygenase และสาร pro-inflammatory cytokines การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดหอมแดงและกระเทียมโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสาร Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟีนอลรวม เป็น 15.964 ± 0.122 และ 4.020 ± 0.009 มก.สมมูลกับกรดแกลลิก/ก. ของสารสกัด ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสารอลูมิเนียมคลอไรด์ พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเป็น 11.742 ± 0.012 และ 7.669 ± 0.038 มก.สมมูลกับสารเคอร์ซีทิน/ก. ของสารสกัด ตามลำดับ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในการรักษาภาวะข้ออักเสบรูมาตอยด์หรือโรคที่เกิดจากภาวะการอักเสบอื่นและควรทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป

| | |
|-----------------|---|
| Research Title | The Study of Analgesic Activity of the Extract from <i>Allium ascalonicum</i> |
| Head of Project | Nuttiya Werawattanachai |
| Co-researcher | Rawiwun Kaewamatawong |
| Fiscal Year | 2012 |
| Keywords | shallot, garlic, analgesic action, anti-inflammatory action, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, total phenolic compounds, total flavonoid compounds |

ABSTRACT

Shallot (*Allium ascalonicum* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) are well known and widely used medicinal herb. This study was aimed to investigate the biological activities of the ethanolic extracts obtained from the bulbs of shallot and garlic. The antinociceptive activity of the extracts of shallot and garlic were determined using hot-plate and tail-flick models in mice. Hot-plate and tail-flick latencies were determined in male ICR mice prior to the administration of normal saline solution (10 mL/kg, i.p.), morphine (10 mg/kg, i.p.), and various doses of shallot and garlic (100-1200 mg/kg, i.p.) and were subsequently determined at 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 min. The mean percent maximum possible effect (%MPE) were calculated and used in the determination of the area of analgesia (%MPE-min). All doses of shallot and garlic extracts did not produce analgesic response in the hot-plate and tail-flick tests. The anti-inflammatory effects of shallot and garlic extracts on *E. coli* lipopolysaccharide (*E. coli* LPS) induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 in the murine macrophage cell line RAW 264.7 were examined. In MTT assays, shallot and garlic extracts at the concentration 0.0625-0.250 mg/ml did not show any significant cytotoxic

effect on RAW 264.7. The gene expressions were investigated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that shallot and garlic extracts significantly attenuated the expression of iNOS, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in a concentration-dependent manner. The garlic extract caused reduction in *E. coli* LPS -induced COX-2 and COX-1 mRNA expression. The shallot extract suppressed production of mRNA for COX-1, while did not significantly affect COX-2. These results suggest that the anti-inflammatory properties of shallot and garlic extracts may be due to the inhibitory effects on iNOS, cyclooxygenase enzymes and pro-inflammatory cytokines. Total phenolic content analysis were performed by Folin-Ciocalteu reaction. The total phenolic compounds of shallot and garlic extracts were 15.964 ± 0.122 , 4.020 ± 0.009 mg gallic acid equivalent. g^{-1} plant extract, respectively. Total flavonoid contents were determined by aluminium chloride colorimetric method. Total flavonoid contents of shallot and garlic extracts in term of quercetin equivalent were 11.742 ± 0.012 , 7.669 ± 0.038 mg quercetin equivalent. g^{-1} plant extract, respectively. This study supports the traditional use of shallot and garlic for the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory disorder and further investigations are required to determine the active compounds responsible for the potent anti-inflammatory activity of the ethanolic extracts of shallot and garlic.

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| บทคัดย่อ | ข |
| ABSTRACT | ง |
| สารบัญเรื่อง | ฉ |
| สารบัญตาราง | ฎ |
| สารบัญภาพ | ฏ |
| คำอธิบายสัญลักษณ์ | ต |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 3 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย | 4 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 4 |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม | 5 |
| 2.1 หอมแดง | 5 |
| 2.2 กระเทียม | 6 |
| 2.3 ความเจ็บปวด | 8 |
| 2.4 การอักเสบ | 10 |
| บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย | 14 |
| 3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์และสัตว์ทดลอง | 14 |
| 3.1.1 สารเคมี | 14 |
| 3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ | 14 |
| 3.1.3 สัตว์ทดลอง | 15 |

| | |
|---|----|
| 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย | 15 |
| 3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากหอมแดง (<i>Allium ascalonicum</i> L.) และสารสกัดจากกระเทียม (<i>Allium sativum</i> L.) ในเอธานอล | 15 |
| 3.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการระงับความปวดในสัตว์ทดลอง | 18 |
| 3.2.2.1 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วย Mouse Hot-Plate Method | 18 |
| 3.2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วย Mouse Tail-Flick Method | 20 |
| 3.2.3 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบจากสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 | 22 |
| 3.2.3.1 การเลี้ยงเซลล์ | 22 |
| 3.2.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT reduction assay | 22 |
| 3.2.3.3 การศึกษาผลสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) | 23 |
| 3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compound) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยวิธี Folin- Ciocalteus | 26 |
| 3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid compound) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม | 28 |
| 3.3. การรายงานผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ | 30 |
| 3.4 สถานที่ทำการวิจัย | 31 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | 32 |

| | |
|--|----|
| 4.1 ผลการเตรียมสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล | 32 |
| 4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมในเอธานอลในสัตว์ทดลอง | 33 |
| 4.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมใน Hot plate test | 33 |
| 4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมใน Tail-Flick test | 36 |
| 4.3 ผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบจากสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 | 39 |
| 4.3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมด้วย MTT Test | 39 |
| 4.3.2 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค RT-PCR | 40 |
| 4.3.2.1 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน iNOS | 41 |
| 4.3.2.2 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน COX-2 | 44 |
| 4.3.2.3 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน COX-1 | 47 |
| 4.3.2.4 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน TNF- α | 50 |
| 4.3.2.5 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β | 53 |
| 4.3.2.6 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน IL-6 | 56 |
| 4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยวิธี Folin-Ciocalteus | 59 |
| 4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม | 61 |
| บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ | 63 |
| 5.1 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง | 63 |

| | |
|--|-----|
| 5.2 ข้อเสนอแนะ | 70 |
| เอกสารอ้างอิง | 71 |
| ภาคผนวก | 78 |
| การขอรับใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี | 79 |
| การดำเนินการขออนุญาตซื้อขายเสพติดให้โทษประเภทที่ 2 จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา | 82 |
| NRCT-JSPS RESEARCH REPORT PRELIMINARY STUDY“Effect of Shallot Extract on the Expression of Inflammatory Mediators, iNOS and COX-2” | 93 |
| การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) | 106 |
| 6.1 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Cancer cell growth inhibition) ได้แก่ | 107 |
| - เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB: human oral cavity carcinoma ATCC CCL-17) | |
| - เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7: human breast adenocarcinoma ATCC HTB22) | |
| - เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187: human small cell lung carcinoma ATCC CRL-5804) | |
| 6.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (Vero cells) | 108 |
| 6.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ <i>Candida albicans</i> | 108 |
| 6.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H ₃₇ Ra) | 109 |
| 6.5 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคใบไหม้ในข้าว <i>Magnaporthe grisea</i> | 110 |
| 6.6 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโรคเมล็ดด่างในข้าว <i>Curvularia lunata</i> | 111 |
| 6.7 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก <i>Bacillus cereus</i> | 111 |
| 6.8 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuramidase ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 | 112 |
| ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ | 114 |
| POSTER PRESENTATION In 18th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN) | 117 |

“Agriculture, Food and Nutrition for Health and Wellness”

December 1-3, 2014: Ubon Ratchathani, THAILAND

Manuscript สำหรับการตีพิมพ์ในวารสารงานวิจัยระดับนานาชาติ

121

ประวัตินักวิจัย

134

สารบัญตาราง

| | ตาราง | หน้า |
|--------------|--|------|
| ตารางที่ 3-1 | Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR | 24 |
| ตารางที่ 3-2 | ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA | 25 |
| ตารางที่ 3-3 | การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม | 27 |
| ตารางที่ 3-4 | การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม | 29 |
| ตารางที่ 4-1 | แสดงน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง น้ำหนักสารสกัดหยาบ ค่า % yield และลักษณะของสารสกัดหยาบจากส่วนหัวของหอมแดงและกระเทียม | 33 |
| ตารางที่ 4-2 | Mouse Hot-Plate Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล (100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว | 35 |
| ตารางที่ 4-3 | Mouse Tail-Flick Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และสารสกัดหอมแดงในเอธานอล (100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว | 38 |
| ตารางที่ 4-4 | ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล | 62 |
| ตารางที่ 6-1 | ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยศูนย์ BIOTEC | 116 |

สารบัญภาพ

| รูปที่ | รูปที่ | หน้า |
|------------|--|------|
| รูปที่ 3-1 | ตัวอย่างหัวหอมแดงและหัวกระเทียม | 16 |
| รูปที่ 3-2 | การหมักหัวหอมแดงและหัวกระเทียม | 16 |
| รูปที่ 3-3 | การระเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator | 17 |
| รูปที่ 3-4 | การทำให้สารสกัดแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer | 17 |
| รูปที่ 3-5 | เครื่องมือ Hot-plate analgesia meter | 18 |
| รูปที่ 3-6 | Mouse restrainer และเครื่องมือ Tail-flick analgesia meter | 20 |
| รูปที่ 4-1 | แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบของหอมแดงและกระเทียมที่ผ่านการทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dryer | 32 |
| รูปที่ 4-2 | Mouse Hot-Plate Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และมอร์ฟีน (morphine sulfate; 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว | 34 |
| รูปที่ 4-3 | Mouse Tail-Flick Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และมอร์ฟีน (morphine sulfate; 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว | 37 |
| รูปที่ 4-4 | ลักษณะเซลล์ Murine macrophage RAW 264.7 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย | 39 |
| รูปที่ 4-5 | ผลของสารสกัดสารสกัดหอมแดง (Shallot) และสารสกัดกระเทียม (Garlic) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรื้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 เมื่อทดสอบด้วย MTT Assay | 40 |
| รูปที่ 4-6 | ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 42 |
| รูปที่ 4-7 | ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสาร | 43 |

| | | |
|-------------|---|----|
| | สกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3) | |
| รูปที่ 4-8 | ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 45 |
| รูปที่ 4-9 | ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3) | 46 |
| รูปที่ 4-10 | ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 48 |
| รูปที่ 4-11 | ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3) | 49 |
| รูปที่ 4-12 | ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 51 |
| รูปที่ 4-13 | ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3) | 52 |
| รูปที่ 4-14 | ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 54 |
| รูปที่ 4-15 | ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย <i>E. coli</i> LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสาร | 55 |

- สกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)
- รูปที่ 4-16 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 57
- รูปที่ 4-17 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3) 58
- รูปที่ 4-18 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหา Total Phenolic Compounds ด้วยวิธี Folin-Ciocalteus 60
- รูปที่ 4-19 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Quercetin (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหา Total Flavonoid Compounds 62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|--------------------|---|--|
| ก. | = | กรัม |
| กก. | = | กิโลกรัม |
| มก. | = | มิลลิกรัม |
| มคก. | = | ไมโครกรัม |
| มล. | = | มิลลิลิตร |
| AUC | = | Area under the curve |
| COX-1 | = | Cyclooxygenase-1 |
| COX-2 | = | Cyclooxygenase-2 |
| DMEM | = | Dulbecco's modification of Eagle's medium |
| DMSO | = | Dimethyl sulfoxide |
| <i>E. coli</i> LPS | = | <i>Escherichia coli</i> lipopolysaccharide |
| iNOS | = | inducible nitric oxide synthase |
| LPS | = | lipopolysaccharide |
| %MPE | = | percent of maximum possible effect |
| MTT | = | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| NO | = | Nitric oxide |
| TNF- α | = | Tumor necrosis factor-alpha |
| % | = | ร้อยละ |
| $^{\circ}\text{C}$ | = | องศาเซลเซียส |
| Kg | = | กิโลกรัม |
| mg | = | มิลลิกรัม |
| ml | = | มิลลิลิตร |
| nm | = | นาโนเมตร |

μg = ไมโครกรัม

μl = ไมโครลิตร

M = โมลาร์

บทที่ 1

บทนำ

(Introduction)

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ความเจ็บปวด (pain) เป็นประสบการณ์ที่ไม่พึงพอใจทั้งทางด้านความรู้สึกและอารมณ์ โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายหรือศักยภาพในการทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อของร่างกาย กลไกการเกิดความเจ็บปวดประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 ประการคือ สิ่งกระตุ้นความเจ็บปวด ตัวรับความรู้สึกเจ็บปวด (Nociceptors) ซึ่งกระจายอยู่ทั่วร่างกาย เช่น ผิวหนัง อวัยวะภายใน หลอดเลือด หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ และวิถีประสาทนำความรู้สึกเจ็บปวด (Pain impulse pathways) ที่รับสัญญาณขึ้นไปสู่สมองเพื่อแปลเป็นความรู้สึก และมีการแสดงออกทางพฤติกรรมต่าง ๆ เพื่อตอบสนองสิ่งที่กระตุ้น ความเจ็บปวดเป็นอาการที่พบได้บ่อย ๆ ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการเกิดการอักเสบ หรืออาจเกิดจากการที่มีสิ่งกระตุ้น เช่น ความร้อน แสงกล สารเคมี มาทำให้เจ็บปวดโดยตรง (อำนาจ ธิฐาพันธ์, 2009)

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนเกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์ภายในร่างกายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลง หรือสิ่งกระตุ้นที่ก่ออันตรายเช่น จุลชีพ เพื่อพยายามขจัดสิ่งที่ก่อให้เกิดอันตรายนั้นออกไป รวมทั้งเพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย การอักเสบก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่หลอดเลือดเล็ก ๆ ส่งผลให้สารภายในหลอดเลือดรั่วสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์และมีการเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น Prostaglandins (PGs) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) Leukotrienes (LTs) Tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL), platelet activating factor (PAF), bradykinin, histamine, interferons (IFN) และ complement system โดยสารเคมีต่างๆ เหล่านี้จะกระตุ้นเซลล์ประสาทส่วนปลายในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ และในระบบประสาทส่วนกลางทำให้ร่างกายมีความรู้สึกเจ็บปวดเกิดขึ้น (ปราโมทย์ มหคุณากร, 2553)

สาร NO และ prostaglandins PGE₂ ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil และ macrophage โดยเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS)

ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จัดเป็น inducible enzyme โดยจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นจำนวนมากด้วยสาร pro-inflammatory cytokine และ endotoxin ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง ร้อนอย่างต่อเนื่องหากสารสื่อกลางการอักเสบนี้มีมากขึ้นและพบเป็นระยะเวลาในร่างกายอาจทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังและเกิดโรคเสื่อมต่างๆ ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ภาวะช็อกที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้ออย่างรุนแรงทั่วร่างกาย (Calixto et al., 2004) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS, COX-2 และการยับยั้งการหลั่งของ สาร TNF- α , IL-1 β และ IL-6 จึงเป็นแนวทางหลักสำคัญทางหนึ่งในการควบคุมการอักเสบได้

การรักษาอาการเจ็บปวดและการอักเสบในปัจจุบันมักใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) แม้จะให้ผลการรักษาดีแต่อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น เกิดแผลในกระเพาะอาหารและมีความเป็นพิษต่อไต ปัจจุบันมียารุ่นใหม่ที่มีฤทธิ์ข้างเคียงเหล่านี้ลดลงแต่มีราคาค่อนข้างแพง เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดเป็นแหล่งของยาที่สำคัญ เนื่องจากพืชเหล่านี้มักจะมีสารสำคัญหลายชนิด และแต่ละชนิดก็ยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวางและถูกนำมาใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ รวมถึงใช้เป็นยารักษาโรคได้อีกด้วย การพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์นับเป็นทางหนึ่งที่จะช่วยลดการเสียดุลทางเศรษฐกิจและเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้ผู้ที่มีความเจ็บปวดหรือมีอาการอักเสบมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

หอมแดงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย มีการปลูกมากทั้งในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หอมแดง มีชื่อภาษาอังกฤษ คือ shallot และชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Allium ascalonicum* L. จัดเป็นพืชในสปีชีส์ *Allium* โดยตัวอย่างพืชในสปีชีส์นี้ได้แก่ กระเทียม (*Allium sativum* L.) หอมใหญ่ (*Allium cepa* L.) ปัจจุบันพบผลิตภัณฑ์กระเทียมออกวางจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งได้รับความนิยมและการยอมรับจากผู้บริโภคว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด และใช้ในผู้ป่วยหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) ไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) ลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) ความดันโลหิตสูง (hypertension) และเบาหวาน (diabetes) (Banerjee and Maulik, 2002)

รายงานการวิจัยที่แสดงฤทธิ์ระงับปวดของหอมแดง ได้แก่ Owoyele และคณะ (2006) ทำการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดของ *Allium ascalonicum* ในเมธานอลและในชั้นน้ำ พบว่า สารสกัดในชั้นเมธานอลสามารถระงับปวดได้ดีใน formalin test ในหนูขาว และสามารถระงับปวดในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิด

ความเจ็บปวดด้วยความร้อน ในขณะที่สารสกัด *Allium ascalonicum* ในชั้่นน้ำมีฤทธิ์ระงับปวดที่อ่อน Oloyede และคณะ (2008) รายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องดื่มสมุนไพร (herbal cocktail) JOLOO ที่มีส่วนผสมของหอมแดงในสูตรเครื่องดื่มสมุนไพร เมื่อเมื่อให้เครื่องดื่มสมุนไพรดังกล่าวในหนูทดลองใน ขนาด 400-1600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว แสดงฤทธิ์ระงับปวดใน formalin pain model , acetic acid induced abdominal constriction และใน mouse hot-plate test โดยมีค่า reaction time นานกว่ากลุ่ม ควบคุม

จากการที่หอมแดงเป็นพืชทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและเป็นพืชในวงศ์เดียวกับกระเทียม และมีศักยภาพในการระงับปวด ด้านอักเสบ ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ระงับปวด กลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS ให้มีการแสดงออกของยีนที่เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบและเป็นสารสื่อกลางในการอักเสบ ได้แก่ inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ตลอดจนทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมเพื่อจะ ทำให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนให้นำไปสู่การพัฒนาสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมเป็นยา ระงับปวด ด้านอักเสบเพื่อใช้ประโยชน์ในทางคลินิกต่อไป นับเป็นการเพิ่มคุณค่าของพืชสมุนไพรพื้นบ้านและ ส่งเสริมและสนับสนุนการใช้สมุนไพรไทยประจำท้องถิ่นอย่างมีเหตุผล

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในเอธานอล ในหนูถีบจักรเพศผู้พันธุ์ ICR ด้วยวิธี Hot-plate และ Tail-flick
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลใน เซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ด้วยสาร *E. coli* LPS
3. วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลโดยใช้

ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสาร Folin-Ciocalteu

4. วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสารอลูมิเนียมคลอไรด์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมโดยเลือกทดสอบในสารสกัดที่ใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย ทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดในสัตว์ทดลอง และศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัด เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการประเมินความเป็นไปได้ในการพัฒนาหอมแดงเป็นยาต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์แก้ปวด ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ง่ายในประเทศ
2. ได้รับข้อมูลกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม ที่มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS
3. เป็นข้อมูลวิทยาศาสตร์สนับสนุนสรรพคุณของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน โดยเผยแพร่ความรู้ให้แก่ประชาชนทั่วไป เป็นการส่งเสริมและสนับสนุนการใช้สมุนไพรไทยประจำท้องถิ่นอย่างเหมาะสม
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยในมนุษย์ ต่อไป เช่น การวิจัยทางเภสัชจลนศาสตร์ หรือการวิจัยทางคลินิก
5. เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรที่หาได้ง่ายในประเทศ นำไปสู่การพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

(Literature Review)

2.1 หอมแดง

หอมแดง (shallot) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Allium ascalonicum* Linn. ชื่อท้องถิ่น ได้แก่ หอมแดง หอมเล็ก หอมหัว หอมไทย (ภาคกลาง) หอมบัว หอมบัว (ภาคเหนือ) หัวหอมแดง (ภาคใต้) ปะเข้ซ่า (ปะเหลียง-แม่ฮ่องสอน) ปะเขอก่อ (กระเหรี่ยง-ตาก) ส่วนที่ใช้คือส่วนต้นหรือส่วนหัว หัวหอมแดงเป็นทั้งเครื่องเทศและสมุนไพร จัดเป็นพืชในสปีชีส์ *Allium* สรรพคุณของหอมแดง ได้แก่ ส่วนหัวใช้ขับลมในลำไส้ แก้ไข้ ขับเสมหะ เจริญไฟธาตุ แก้อาการเมาค้างจากเหล้า บำรุงหัวใจ ฆ่าพยาธิ แก้อาการชักในเด็ก แก้อาการอักเสบต่าง ๆ แก้อักเสบเพราะตะปูและหนามตำ แก้พิษปวดแสบปวดร้อนจากไฟลวก น้ำร้อนลวก แก้พิษสัตว์กัดต่อย องค์ประกอบทางเคมีที่พบ ได้แก่ สาร allicin, *Allium ascalonicum* lectin, *allium ascalonicum* lectin AAA, arbutin และ calcium oxalate (นันทวัน บุญยะประภัศร์และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2543) และพบสาร flavonoids ได้แก่ quercetin aglycone และ quercetin glucosides (Wiczowski, et al., 2008)ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Amin and Kapadnis,2005) ต้านเชื้อรา (Yin. and Tsao,1999; Wang and Ng, 2002) ต้านการชัก ลดความดันโลหิต แก้ปวด ทำให้หัวใจเต้นช้ากว่าปกติ กระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติก มีผลต่อระบบเลือด ละลายไฟบริน ทำให้ลิ่มเลือดสลายตัวเร็วขึ้น ลดคลอเรสเตอรอล ยับยั้งการเกิดเนื้องอก ยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้ คลายกล้ามเนื้อเรียบ สารสกัดหอมแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Leelarungrayub, et al., 2004; Leelarungrayub, et al., 2006) สามารถช่วยลดอาการไม่พึงประสงค์ต่อไตของยา cyclosporine ในหนูขาว (Wongmekiat, et al., 2008) ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวที่ได้รับการกระตุ้นให้มีภาวะดื้อต่ออินซูลินด้วยฟรุกโตส (Jalal et al., 2007) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Seyfi et al., 2010) ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Mohammadi-Motlagh et al., 2011).

Oloyede AM และคณะ (2008) รายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องดื่มสมุนไพร (herbal cocktail) JOLOO ที่มีส่วนสกัดของหอมแดงในสูตรเครื่องดื่มสมุนไพร โดย JOLOO ประกอบด้วยพืชสมุนไพร

ของประเทศแอฟริกา จำนวน 7 ชนิด คือสารสกัดจากเมล็ดของพืช *Butyrospermum paradoxum* (PCGH 437), เปลือกลำต้นของ *Securidata longepunculata* (PCGH439), ลำต้นของ *Tetrapleura tetraptera* (PCGH 382), ส่วนใบของ *Hoslurdia opposita* (PCGH 322), เมล็ดของ *Xylopia aethiopica seed* (PCGH 441), ลำต้นของ *Olax subscorpioidea* (PCGH 438) และไม่ปรากฏส่วนที่ใช้ของ *Allium ascalonicum* (PCGH 440) ในอัตราส่วน 5:1:3:2:4:1:3 เมื่อให้สูตรเครื่องตีผสมสมุนไพรดังกล่าวในหนูทดลองในขนาด 400-1600 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แสดงฤทธิ์ระงับปวดใน formalin pain model , acetic acid induced abdominal constriction และใน mouse hot-plate test โดยมีค่า reaction time นานกว่ากลุ่มควบคุม

Owoyele และคณะ (2006) ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในหนูขาวของสารสกัด *Allium ascalonicum* ในเมธานอลและในชั้นน้ำ ในขนาด 50-200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ด้วยวิธี albumin-induced paw edema พบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้โดยสามารถลดการอักเสบแบบเฉียบพลันของเท้าหนูที่ได้รับการชักนำให้เกิดการบวมด้วยสาร albumin ได้คิดเป็นร้อยละ 40.5-85.5 และสารสกัดในชั้นเมธานอลสามารถลดการบวมของเท้าหนูได้ดีกว่าสารสกัดในชั้นน้ำ Mohammadi-Motlagh และคณะ (2011) รายงานฤทธิ์ด้านการอักเสบเมื่อทดสอบด้วยวิธี acetic acid induced vascular permeability พบว่าสารสกัด *Allium ascalonicum* ในชั้นน้ำ ในขนาด 50-400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ให้โดยการป้อนทางปากในหนูถีบจักร พบว่าสามารถลดสภาวะการซึมผ่านของสาร Evans blues ผ่านผนังหลอดเลือด เข้ามาอยู่ในช่องท้องของหนูถีบจักรได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้รับ คิดเป็นร้อยละ 10-80

2.2 กระเทียม

กระเทียมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* Linn. อยู่ในวงศ์ Alliaceae ชื่อท้องถิ่น ได้แก่ กระเทียมขาว กระเทียมจีน เทียม ปะเข้วา หอมขาว หอมเทียม หัวเทียม ลักษณะทั่วไปเป็นพืชล้มลุกที่มีหัวอยู่ใต้ดิน แต่ละหัวประกอบด้วยกลีบเรียงซ้อนกันประมาณ 4-15 กลีบ บางพันธุ์จะมีเพียงกลีบเดียวเรียกว่ากระเทียมโทน แต่ละกลีบมีกาบเป็นเยื่อบางๆ สีขาวอมชมพูหุ้มอยู่โดยรอบ มีรากไม่ยาวนัก ใบมีลักษณะยาวแบนปลายใบแหลมแคบ โคนมีใบหุ้มซ้อนกัน เป็นใบประกอบชนิดมีใบย่อยใบเดียว เรียงสลับ รูปวงรีหรือรูปไข่ขอบขนานกว้าง 3-5 ซม. ยาว 4-8 ซม. เนื้อใบมีจุดน้ำมันกระจาย ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือช่อ มีสีขาวติดเป็นกระจุกที่ปลายก้านช่อดอก ที่ปลายกิ่งและที่ซอกใบกลีบดอกสีขาว กลิ่นหอม ร่วงง่าย กิ่งอ่อนมีหนาม ผลเป็นผลสด กลมเกลี้ยงฉ่ำน้ำ มีกลิ่นหอมฉุน รสชาติเผ็ดร้อน

สารสำคัญที่พบในกระเทียม คือ Allicin (Diallydisulphide oxide) ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกกำมะถัน มีลักษณะเป็นน้ำมันใส ละลายน้ำและสลายตัวเมื่อถูกความร้อน นอกจากนี้ในกระเทียมยังประกอบด้วย โปรตีน น้ำตาล กรดไขมัน กรดอะมิโน แร่ธาตุ และวิตามินหลายชนิดเช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และวิตามินซี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ Allinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยน Alliin ให้เป็น Allicin และมีสาร Quercetin ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์และ Cytokines ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้ (วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระเทียมได้แก่ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ ฤทธิ์ขับน้ำดี ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการแน่นจุกเสียด ฤทธิ์ลดการอักเสบ ฤทธิ์ป้องกันตับอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลาก (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2009) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการลดระดับไขมันในเลือด ลดความดันโลหิต ยับยั้งการจับกลุ่มกันของเกร็ดเลือด สลายลิ่มเลือด (Kendler, 1987; Kunnumakkara et al., 2009), ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Lee et al., 2003) ต้านอนุมูลอิสระ (Shobana and Naidu, 2000; Leelarungrayub et al., 2006) ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Eidi, 2006) มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Thomson and Ali, 2003; Tsubura et al., 2011) และต้านการอักเสบ (Dirsch and Vollmar, 2001; Leelarungrayub, et al., 2004; Park et al., 2012) Kumar และ Reddy (1999) ศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและฤทธิ์ระงับปวดในหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานด้วยสาร alloxan โดยให้สารสกัดกระเทียมชั้นเอธานอล ในขนาด 45 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว นาน 28 วัน พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ เมื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วยวิธี tail-flick, hot plate และ formalin test พบว่าสามารถบรรเทาอาการปวดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Gorji (2003) รายงานว่ากระเทียมเป็นพืชสมุนไพรที่ปรากฏในตำรายาของชาวเปอร์เซีย สามารถบรรเทาอาการปวดศีรษะ แบบ cold humour headache และ Sarrell และคณะ (2003) รายงานว่ามีการใช้สมุนไพรกระเทียมเป็นส่วนประกอบของยาสมุนไพรทางเลือกที่ใช้รักษาอาการเจ็บหูในเด็ก

ปัจจุบันพบผลิตภัณฑ์กระเทียมออกวางจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งได้รับความนิยมและการยอมรับจากผู้บริโภคว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถ ป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด และใช้ในผู้ป่วยหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) ไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) ลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) ความดันโลหิตสูง (hypertension) และเบาหวาน (diabetes) (Banerjee and Maulik, 2002)

2.3 ความเจ็บปวด

International Association for the Study of Pain (IASP) ได้ให้คำนิยามของ Pain (ความปวด) ไว้ดังนี้ : “Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage or described in terms of such damage “ (IASP, 1979) ซึ่งแปลความได้ว่า ความเจ็บปวดเป็นประสบการณ์ที่ไม่พึงพอใจทั้งทางด้านความรู้สึกและอารมณ์ โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายหรือศักยภาพในการทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อของร่างกาย แนวความคิดในปัจจุบันได้ยอมรับว่ามีองค์ประกอบทางมิติต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องได้แก่มิติด้านสรีรวิทยา ด้านการรับรู้ความรู้สึก ด้านอารมณ์ ด้านความเข้าใจและพฤติกรรม ตลอดจนด้านสังคมและวัฒนธรรม กลไกการเกิดความเจ็บปวดประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 ประการคือ สิ่งกระตุ้นความเจ็บปวด (Pain stimuli or Noxious stimuli) ตัวรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวด (Pain receptors or Nociceptors) และวิถีประสาทนำความรู้สึกเจ็บปวด (Pain impulse pathways)

1. สิ่งกระตุ้นความเจ็บปวด (Pain stimuli or noxious stimuli) แบ่งเป็น 3 ประเภท คือ
 - 1.1 สิ่งกระตุ้นเชิงกล (Mechanical stimuli) ได้แก่ การทำลายเนื้อเยื่อจากการผ่าตัด
 - 1.2 การบวมจากการอักเสบ การอุดตันของหลอดเลือด และการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ
 - 1.3 สิ่งกระตุ้นอุณหภูมิ (Thermal stimuli) ได้แก่ ความร้อน ความเย็น และกระแสไฟฟ้า

สิ่งกระตุ้นที่เป็นสารเคมี (Chemical stimuli) ซึ่งมีทั้งสารเคมีภายใน และภายนอกในร่างกาย สารชีวเคมีภายในร่างกายได้แก่ ฮิสตามีน (Histamine) โพรสตาแกลนดิน(Prostaglandin) แบริดีไคนิน (Bradykinin) และสารภายนอกในร่างกาย ได้แก่ กรดต่าง สิ่งทีกระตุ้นความเจ็บปวดเหล่านี้จะไปกระตุ้นโดยตรงต่อตัวรับรู้ความเจ็บปวด (Primary afferent nociceptor) หรือความเจ็บปวดนั้นอาจเกิดขึ้นได้จากสิ่งกระตุ้นนั้นไปทำลายเนื้อเยื่อ ทำให้มีการหลั่งสารเคมีบางอย่างออกไปกระตุ้นตัวรับรู้ความเจ็บปวด ได้แก่ โพตัสเซียมไอออน (K^+) Bradykinin Serotonin Histamine และ Neurokinin สารเหล่านี้จะกระตุ้นเซลล์ประสาทรับความรู้สึก ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเซลล์ประสาท (Depolarization) ทำให้มีการนำกระแสประสาทเกิดขึ้น ถ่ายทอดเป็นสัญญาณประสาทส่งไปตามเส้นประสาท เข้าสู่ไขสันหลังและสมองเพื่อให้รับรู้และตอบสนองต่อความเจ็บปวดตามลำดับ ขณะเดียวกันเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายและมีการอักเสบจะหลั่งสารชีวเคมีบางอย่างทำให้เซลล์ประสาทรับความรู้สึกไวต่อการกระตุ้น คือ Prostaglandin Substance P เป็นผลให้เนื้อเยื่อไวต่อความเจ็บปวดง่ายขึ้น bradykinin และ cytokines (เช่น $TNF-\alpha$, interleukin 1, interleukin 8) มีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดความ

เจ็บปวดในภาวะที่มีการอักเสบ โดยกระตุ้นให้มีการหลั่ง prostaglandins และสารสื่อกลางอื่น ๆ ออกมาทำให้เกิดภาวะไวในการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวด

2. ตัวรับรู้ความรู้สึกปวด (Pain receptor or nociceptors) สามารถรับการกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย เป็นปลายประสาทอิสระ (Free nerve ending) ตัวรับรู้ความเจ็บปวดที่สำคัญมีอยู่ 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มแรก คือ ตัวรับรู้ความเจ็บปวดเชิงกลที่มีความทนต่อความเจ็บปวดในระดับสูง (High threshold) รับความรู้สึกปวดคล้ายเข็มแทง (Pain prick) และตัวรับรู้ความเจ็บปวดจากความร้อน (Heat nociceptor) ซึ่งกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่บนผิวหนังทั้งหมด กลุ่มที่สอง คือ ตัวรับรู้ความเจ็บปวดที่มาจากหลายทาง (Polymodal nociceptor) รับสิ่งกระตุ้นที่เป็นแรงกด แรงทับ ความร้อน และสารเคมีทั้งหมด ตัวรับรู้ความเจ็บปวดชนิดนี้จะอยู่ทั่วไปทุกเนื้อเยื่อทั้งในระดับตื้น และลึกโดยเฉพาะที่อวัยวะภายใน เมื่อมีสิ่งกระตุ้นเชิงกล อุณหภูมิ และสารเคมี ปลายประสาทอิสระจะถูกกระตุ้นจนถึงระดับความทนต่อความเจ็บปวด (Pain threshold) เกิดเป็นกระแสประสาทความรู้สึกปวด (Pain impulse) ส่งไปตามเส้นประสาทสู่ไขสันหลังและสมอง สำหรับตัวรับรู้ความรู้สึกเฉพาะเรียกว่า ตัวรับรู้ความเจ็บปวดเชิงกลที่มีความทนต่อความเจ็บปวดในระดับต่ำ (Low threshold mechanoreceptor) จะรับรู้ความรู้สึกการสัมผัส การสั่นสะเทือน ถ้าถูกกระตุ้นด้วยการสั่นสะเทือนหรือการนวด จะสามารถยับยั้งสารสื่อกระตุ้นความเจ็บปวดได้ในระดับไขสันหลัง

3. วิธีประสาทนำความรู้สึกปวด (Pain impulse pathways) ประกอบด้วย

3.1 โยประสาท เอ – เบต้า หรือโยประสาทใหญ่ที่มีเปลือกหุ้ม (A – beta fiber or large myelinated fiber) จะนำความรู้สึกได้เร็ว รับสัญญาณประสาทจากตัวรับรู้ความเจ็บปวดเชิงกลที่มีความทนต่อความเจ็บปวดในระดับต่ำ ซึ่งเป็นตัวรับเฉพาะ เช่นความรู้สึกสัมผัสการสั่นสะเทือน เป็นต้น

3.2 โยประสาทเอ – เดลต้า หรือโยประสาทเล็กที่มีเปลือกหุ้ม (A – delta fiber or small myelinated fiber) ตัวรับรู้ความเจ็บปวดเชิงกลที่มีความทนต่อความเจ็บปวดในระดับสูง และตัวรับรู้ความเจ็บปวดจากความร้อน จะนำความเจ็บปวดชนิดแหลมคมหรือความรู้สึกร้อน จะนำความรู้สึกได้ช้ากว่าโยประสาทเอ – เบต้า สามารถบอกตำแหน่งที่ปวดได้ชัดเจน และความรู้สึกปวดจะหมดไปเร็ว

3.3 โยประสาทซีหรือโยประสาทเล็กที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (C – fiber or small unmyelinated fiber) ตัวรับรู้ความเจ็บปวดที่มาจากหลายทางจะนำความรู้สึกได้ช้ากว่าโยประสาท เอ – เดลต้า โดยจะนำความเจ็บปวดแบบตื้อๆ (Dull pain) ปวดแสบปวดร้อน (Burning) หรือปวดร้าว (Aching pain) บอกตำแหน่งไม่ได้ชัดเจน

ในร่างกายมีกลไกการเกิดการปรับเปลี่ยน (modulation) ของ nociception ทำให้ปวดมากขึ้น (facilitation) หรือลดลง (inhibition) ได้ โดยในส่วนของไขสันหลัง มีการเกิด Spinal modulation หรือ central sensitization :ซึ่งทั้ง stimuli และ nerve injury ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงใน dorsal horn โดยพบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะ dynamic คือ neuroplasticity ทำให้ตอบสนองต่อ mechanical stimuli เพิ่มมากเป็นความรู้สึกปวดมากขึ้น (secondary hyperalgesia) เรียกว่าเกิด "wind up" จากการศึกษาเกี่ยวกับ neurotransmitter พบว่าบริเวณ dorsal horn ที่ส่วนปลายของ primary nociceptive afferents มี receptor ทั้ง presynapse และ postsynapse โดย receptor ชนิด N-methyl -D- aspartate (NMDA) จะถูก excitatory amino acid คือ glutamate และ aspartate มาจับทำให้มี "wind up" และปวดมากขึ้นตรงข้ามกับ opioid, alpha adrenergic, gamma aminobutyric acid (GABA) และ serotonin receptor ที่เมื่อถูกจับด้วย neurotransmitter เฉพาะจะลดความปวดได้ และในระดับเหนือไขสันหลัง จะเกิด Supraspinal modulation ร่างกายปรับเปลี่ยนให้ความปวดลดลงโดยผ่านทาง descending inhibitory tract จากระดับ brain stem (periaqueductal gray matter และ reticular formation) ส่งลงมา synapse ที่ dorsal horn โดยปล่อย inhibitory neurotransmitter (endorphins, norepinephrine) ออกมายับยั้งให้ความปวดลดลง

ความรู้สึกปวดจะเกิดขึ้นในส่วนของ thalamus และมีการแปลความรู้สึกที่สมองส่วน cortex และเกิดพฤติกรรมแสดงอาการปวดออกมา (อำนาจ ฤชระพันธ์, 2009) จากการศึกษาที่กลไกความเจ็บปวดมีความซับซ้อนและมีความเกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทหลายประการ ในปัจจุบันมีกลุ่มยาที่ใช้ในทางคลินิกในการบรรเทาปวดหลายกลุ่ม ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับ pain pathway

2.4 การอักเสบ (inflammation)

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาตอบสนองที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อ ต่อสิ่งที่ก่ออันตราย (injurious agent) และต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลง ปฏิกิริยาที่สำคัญในการอักเสบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) ออกจากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อ และ/หรือการเปลี่ยนแปลงในหลายระบบของร่างกาย ปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดขึ้นในระบบหลอดเลือดฝอยภายในเนื้อเยื่อ (microcirculation) เป็นปฏิกิริยาที่ช่วยปกป้องเนื้อเยื่อและกำจัดสิ่งที่ก่ออันตราย (โดยใช้วิธี กำจัดหรือ ทำให้เจือจางหรือจำกัด

บริเวณ) รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลงด้วย ผลจากการอักเสบทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดอาการ 4 ประการ คือ ปวด (pain) บวม (swelling) แดง (redness) และร้อน (heat)

โดยทั่วไป อาจจำแนกชนิดของการอักเสบตามลักษณะการเกิดโรคทางคลินิก และระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ โดยแบ่งออกเป็น การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) มีอาการของการอักเสบในช่วงเวลาเป็นนาที ชั่วโมงหรือวัน และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) มีอาการของการอักเสบในช่วงเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน นอกจากนี้ ยังพบความแตกต่างของชนิดของสารสื่อกลาง (chemical mediator) ในการอักเสบที่พบเป็นหลักในการอักเสบเฉียบพลันและการอักเสบเรื้อรัง การอักเสบแบบเรื้อรังจะส่งผลทำให้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะบริเวณนั้นเกิดความเสียหายหรือพิการได้

สารสื่อกลางการอักเสบ (Inflammatory mediators) ในการอักเสบมีแหล่งที่มาจาก plasma โดยอยู่ในรูปของสารตั้งต้น (precursor) หรือหลั่งออกมาโดยเซลล์บางชนิด mediator เหล่านี้จะไปจับกับ receptor ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันบนเซลล์ต่างๆที่มีบทบาทในการอักเสบ ซึ่งจะถูกระตุ้นให้มีปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้แตกต่างกันไปตามชนิดของ mediator และชนิดของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย (target cell) mediator ส่วนใหญ่มีอายุสั้น มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ไม่นาน mediator บางชนิดกระตุ้นให้เซลล์สร้าง secondary mediator ต่อไปอีกเป็นการขยายผลปฏิกิริยาการอักเสบ Mediator กลุ่มที่สำคัญได้แก่ (สุรพันธุ์ คุณอมรพงศ์, 2555; ปราโมทย์ มหคุณากร, 2553)

1. Vasoactive amine ได้แก่ histamine และ serotonin
2. Nitric oxide (NO) เป็น free radical gas ที่ละลายในน้ำได้ จัดเป็น inflammatory mediator ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ สร้างขึ้นโดย activated macrophage และ endothelial cell ออกฤทธิ์สั้นและเฉพาะที่มีฤทธิ์สำคัญในการส่งเสริมการอักเสบ ได้แก่ ทำให้หลอดเลือดขยายตัว เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณที่มีการอักเสบและออกฤทธิ์เป็น cytotoxic free radical NO ถูกสร้างขึ้นโดยเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งจัดเป็น inducible enzyme โดยจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นปริมาณมากจากสาร pro-inflammatory cytokine และ endotoxin
3. Arachidonic acid (AA) metabolites ได้แก่ prostaglandins และ leukotrienes หรือเรียกรวมกันว่า eicosanoids สาร prostaglandins ถูกสร้างขึ้นจากเอนไซม์ cyclooxygenase มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการอักเสบเกือบทุกขั้นตอน ทั้ง PGI₂ และ PGE₂ มีบทบาทสำคัญในการขยายหลอดเลือด โดยการเพิ่ม cAMP

และลดปริมาณแคลเซียมในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบก่อให้เกิดการบวมและการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยการเพิ่มการไหลเวียนในบริเวณที่มีการอักเสบ สาร PGE₂ มีบทบาทในการ เหนี่ยวนำการสร้าง inflammatory mediator อื่นๆ อีกหลายชนิด ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง และมีไข้ ในปัจจุบันมีการผลิตและจำหน่ายยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ ยับยั้งสาร prostaglandins ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ยากลุ่ม NSAIDs ให้ผลในการต้านการอักเสบที่ตีกรณิที่ผู้ป่วยมีอาการอักเสบเรื้อรัง อาจต้องให้ในระยะเวลานานทำให้มีผลยับยั้งการสร้าง prostaglandins ซึ่งเป็น protective mediators ในกระเพาะอาหารถูกยับยั้งไปด้วย ดังนั้น เยื่อกระเพาะอาหารจึงถูกทำลายโดยกรดเพิ่มมากขึ้น เมื่อใช้ยากลุ่มนี้เป็นเวลานานจะพบอาการไม่พึงประสงค์ได้บ่อย เช่น ปวดท้อง เป็นแผลในระบบทางเดินอาหาร ส่วนยาที่มีผลข้างเคียงต่ำยังมีราคาค่อนข้างสูง

4. Cytokines เป็น polypeptides ที่สังเคราะห์โดยเซลล์หลายชนิด เช่น mononuclear phagocytes, lymphocytes, endothelial และ epithelial cells, fibroblasts และ chondrocytes โดย cytokines มีบทบาทสำคัญทั้งในกระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลันและการอักเสบแบบเรื้อรัง Tumor necrosis factor (TNF)- α จัดเป็นสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) มีฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อและกระตุ้นการผลิตสารตัวกลางสำหรับกระบวนการอักเสบ (inflammatory mediator) หลายชนิด เช่น interleukin-1 (IL-1) interleukin 6 (IL-6) interleukin 8 (IL-8) และ granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) กระตุ้นให้มีการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวบริเวณที่มีการอักเสบเพิ่มมากขึ้น และกระตุ้น gene expression และการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องและก่อให้เกิดการอักเสบ

5. Oxygen-derived free radicals

6. สารสื่อกลางที่สร้างขึ้นจากสารประกอบใน plasma ได้แก่ complement system, kinin system และ clotting system

7. Platelet-activating factor มีฤทธิ์กระตุ้น platelet aggregation และ degranulation

8. สารที่หลั่งจากเม็ดเลือดขาว neutrophil และ monocyte

9. สารสื่อกลางชนิดอื่น neuropeptides (substance P) ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดและเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) ข้างต้นชี้ให้เห็นว่า การยับยั้งการทำงานของ mediators ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบจะเป็นแนวทางสำคัญในการบรรเทาอาการอักเสบ ดังนั้นยาหรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งการสร้างหรือยับยั้งการทำงานของ iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ได้ก็จะสามารถยับยั้งหรือบรรเทาอาการอักเสบได้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

(Methodology)

3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

3.1.1 สารเคมี (Chemicals)

95% Ethanol, Morphine sulfate (1 mg/ml) (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข), Normal saline (0.9%NaCl)

Molecular biology agarose (Bio-Rad, Spain), 1kb DNA ladder (Promega, USA), Blue/Orange 6X loading dye (Promega, USA), Primer β -actin, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Eurofins MWG Operon, Germany), Tris base, glacial acetic acid, EDTA (Ajax/Australia), Omiscrypt RT Kit (QIAGEN, Germany), TopTaq MasterMix kit (QIAGEN, Germany), Novel Juice (GeneDirex), RNA extraction kit (GE Healthcare, UK), 3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dyphenyl tetra-zolium bromide (Invitrogen, USA), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Invitrogen, UK), FBS (Fetal bovine serum, Invitrogen, UK), *Escherichia coli* lipopolysaccharide (*E. coli* LPS, QIAGEN, Germany), RNase free DNase Set (QIAGEN, Germany)

Folin-Ciocalteau reagent, Sodium carbonate, Gallic acid, Methanol A.R.Grade

Quercetin dihydrate, Aluminium chloride, Potassium acetate

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ (Instruments)

Percolator, เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator; Buchi Rotavapor, R-134, Switzerland), เครื่องระเหยแห้ง (Christ Laboratory Freeze dryer, UK)

เครื่องชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลอง Mettler-Toledo Model AT 200, Switzerland, Hot-plate apparatus (Socrel model-DS37), Syringe ขนาด 0.5 มิลลิลิตร & needle no.26, Tail-flick analgesia meter (Harvard Apparatus), Mouse restrainers, Mouse cages



เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge), ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator), Autoclave, Laminar air flow cabinet, Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA), Gel casting platform, Horizontal gel electrophoresis apparatus, Thermal cycler PCR (AB Applied Biosystems GeneAmp PCR system 2400), Gel Documentation InGenius L (Gel Documentation and Analysis system), UV spectrophotometer

3.1.3 สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร (Mouse) เพศผู้ พันธุ์ ICR ที่ใช้จัดซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาสาฯ มีน้ำหนักอยู่ ระหว่าง 18-20 กรัม นำหนูมาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองล่วงหน้าอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้คุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C ควบคุมความมืดและความสว่างโดยเปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปตามมาตรฐานของสำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติ กรงที่ใช้เลี้ยงหนูทดลองจะปูรองพื้นด้วยขี้เลื่อยที่ ผ่านการอบฆ่าเชื้อโรคเพื่อใช้ดูดซับอุจจาระและปัสสาวะ ที่กรงจะมีช่องสำหรับให้น้ำและอาหารแก่หนู โดยหนูสามารถกินและดื่มน้ำได้ตลอดเวลา ในวันที่ทำการทดลองชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวและขีดเครื่องหมายที่หางหนูแต่ละตัวเพื่อแสดงกลุ่มและหมายเลขของหนู

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย (Methods)

3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากหอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) และสารสกัดจากกระเทียม (*Allium sativum* L.) ในเอธานอล

1. ดำเนินการซื้อหัวหอมและกระเทียมจากร้านค้าในจังหวัดศรีสะเกษ ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ให้ถูกต้องและเก็บตัวอย่างไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. นำส่วนหัวของหอมแดงและกระเทียมมาปอกเปลือกและป็นย่อยให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำมาใส่ลงใน percolator ไม่ให้อัดแน่นจนเกินไป (เป็นการหมักหัวหอมแดงและหัวกระเทียมในเครื่อง percolator)
3. นำ 95% เอธานอล ใส่ลงใน percolator ที่ใส่พืชลงไปแล้วโดยเทให้ท่วมพืชขึ้นมาประมาณ 1 นิ้ว ปิดปาก percolator ด้วย aluminium foil ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
4. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้วไซ้สารสกัดออกเก็บไว้ แล้วเติม 95% เอธานอล เข้าไปใหม่ให้ท่วมพืชขึ้นมา

- ประมาณ 1 นิ้ว ปิดปาก percolator ด้วย aluminium foil แล้วทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง จึงไขออก
5. รวบรวมสารละลายที่สกัดได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบความดันต่ำ (rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้หมด
 6. จากนั้น นำสารสกัดที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธีการ freeze dry เพื่อระเหยน้ำออกไป เก็บสารสกัดหอม และกระเทียมในเอธานอลบรรจุในภาชนะปิดสนิทเพื่อทดสอบฤทธิ์
 7. คำนวณหา % yield จากสมการ $\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักพืชที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักพืชแห้ง}} \times 100$



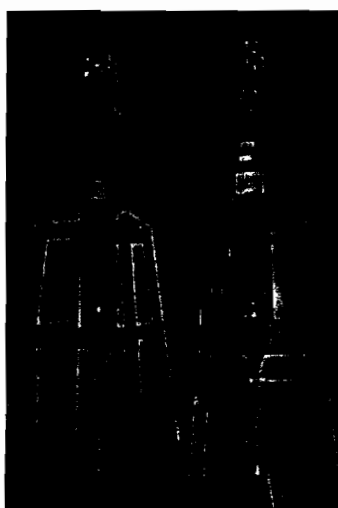
หอมแดง - shallot

(Allium ascalonicum L.)

กระเทียม - Garlic

(Allium sativum L.)

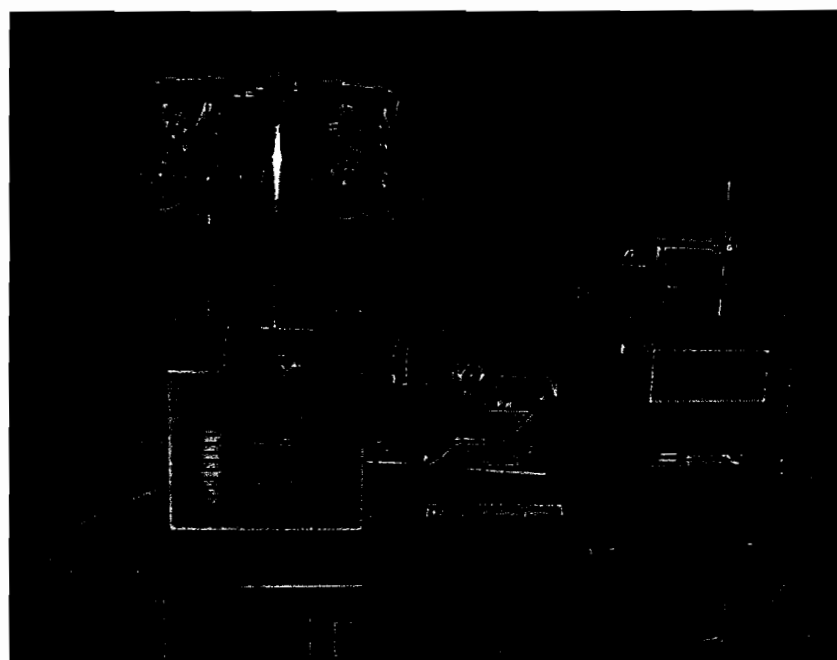
รูปที่ 3-1 ตัวอย่างหัวหอมแดงและหัวกระเทียม



รูปที่ 3-2 การหมักหัวหอมแดงและหัวกระเทียมในเครื่อง Percolator



รูปที่ 3-3 การระเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator



รูปที่ 3-4 การทำให้สารสกัดแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer

3.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการระงับความปวดในสัตว์ทดลอง (Animal models)

3.2.2.1 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วย Mouse Hot-Plate Method (Woolfe and Macdonald, 1944)



รูปที่ 3-5 เครื่องมือ Hot-plate analgesia meter

หลักการ เหนียวนำให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อน โดยวางหนูลงบนแผ่นความร้อน และวัดระยะเวลาที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้โดยไม่ยกอุ้งเท้าหลังขึ้นมาเลียหรือกระโดดอย่างแรง หนูที่ได้รับยาระงับปวดซึ่งออกฤทธิ์ระงับปวดในระดับไขสันหลังและระดับเหนือสันหลังจะสามารถทนต่อความร้อนได้นานขึ้น

วิธีทดลอง ใช้หนูเม้าส์ เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม โดยหนูแต่ละตัวจะถูกวางลงบน hot-plate surface ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 55 ± 0.5 องศาเซลเซียส ครอบด้วยแก้วใส แบ่งหนูเป็นกลุ่มด้วยวิธีสุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว แต่ละกลุ่มทำ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 10 นาที โดยมี cut-off time ที่ 45 วินาทีเพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง สังเกตพฤติกรรมการเลียอุ้งเท้าหลัง หรือการกระโดดอย่างรุนแรง บันทึกเวลาที่สัตว์ทดลองแสดงพฤติกรรมนั้น หนูที่มี pre-drug baseline มากกว่า 45 วินาที จะถูกตัดออกจากทดลอง (หนูตัวที่มี pre-drug baseline มากกว่า 45 วินาทีจะถูกตัดออกจากทดลอง เนื่องจาก การที่หนูทดลองที่สามารถทนความร้อนเมื่อถูกวางบน hot-plate โดยไม่เลียอุ้งเท้าหลังหรือกระโดดอย่างรุนแรง

มี pre-drug baseline มากกว่าค่า cut-off time ที่ 45 วินาที อาจเกิดจากพฤติกรรมของหนูทดลองนั้นที่สามารถทนต่อความปวดได้มาก ตัวกระตุ้นด้วยแผ่นความร้อนไม่สามารถกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดและเกิดการตอบสนองต่อความเจ็บปวดได้ เมื่อให้สารทดสอบหนูทดลองอาจยังคงสามารถอยู่บน hot-plate โดยไม่เลียอุ้งเท้าหลังหรือกระโดดอย่างรุนแรงโดยใช้เวลานานใกล้เคียงกับค่า cut-off time ที่ 45 วินาทีด้วย ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดได้ว่าเกิดจากสารทดสอบหรือไม่ โดยการแปลผลการทดสอบจะหาค่า %MPE ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลา) นำ pre-drug baseline ครั้งที่ 2 และ 3 มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้เป็น baseline ของหนูตัวนั้น จากนั้นให้สารทดสอบในขนาดต่าง ๆ 5 ความเข้มข้น ยาระงับปวดมาตรฐาน (morphine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) หรือ vehicle ทางช่องท้อง แล้วทำการทดสอบ post-drug latency ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาทีหลังให้ยา

วิธีคำนวณ หาค่า Test latency (TL) ของหนูแต่ละตัว โดยค่า

$$\text{Mean of Baseline TL} = (\text{TL ครั้งที่ 2} + \text{TL ครั้งที่ 3}) / 2$$

แปลผลเป็น % MPE (percent maximum possible effect) ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลาโดย

$$\% \text{ MPE} = [(\text{TL หลังได้รับสารทดสอบ} - \text{baseline TL}) / (\text{cut-off time} - \text{baseline TL})] \times 100$$

ค่า Cut-off time = 45 วินาที

คำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC) ของแต่ละกลุ่ม พื้นที่ใต้กราฟที่ได้คือ Area of analgesia

สำหรับ Mean of Baseline Test Latency สามารถคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ Test Latency ครั้งที่สองและครั้งที่สาม จากการทดสอบ pre-drug baseline สามครั้ง โดยครั้งที่หนึ่งจะเป็นการปรับให้หนูทดลองมีความคุ้นเคยกับสภาวะของการทดลองก่อน จึงไม่นำค่า Test Latency ครั้งที่หนึ่งมาคำนวณด้วย)

การศึกษาใน Mouse hot-plate method ประกอบด้วย การศึกษา dose-response curve ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมชั้นเอธานอล ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

ในแต่ละการทดลอง แบ่งหนูออกเป็น 12 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ใช้หนูจำนวน 120 ตัวต่อ 1 การทดลองย่อย โดยทำการแบ่งกลุ่ม ดังนี้

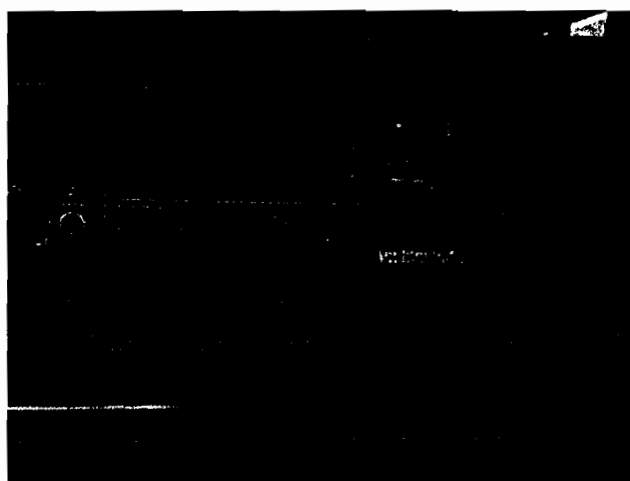
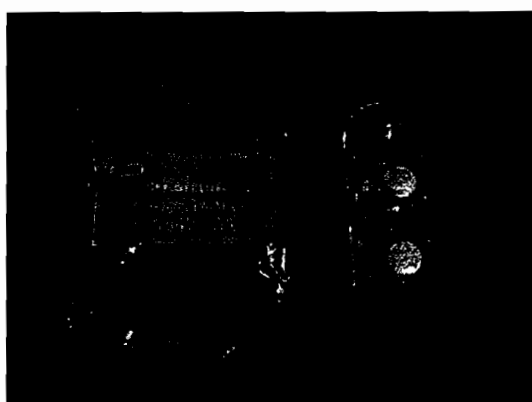
กลุ่มที่ 1 จัดเป็นกลุ่มควบคุม ให้ตัวทำละลาย

กลุ่มที่ 2 ให้ยาระงับปวดมาตรฐาน (morphine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)

กลุ่มที่ 3-7 ให้สารสกัดหอมแดงเพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขนาดตั้งแต่ 100 - 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 8-12 ให้สารสกัดกระเทียมเพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขนาดตั้งแต่ 100 - 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

3.2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วย Mouse Tail-Flick Method (D'Amour and Smith, 1941)



รูปที่ 3-6 Mouse restrainer และเครื่องมือ Tail-flick analgesia meter

หลักการ เหนี่ยวนำให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยรังสีความร้อน โดยใช้แสงส่องลงบนหางหนู และวัดระยะเวลาที่หนูสามารถทนต่อรังสีความร้อนได้โดยไม่สะบัดหางหนีลำแสง หนูที่ได้รับยาระงับปวดซึ่งออกฤทธิ์ระงับปวดในระดับไซสันหลังจะสามารถทนต่อรังสีความร้อนได้นานขึ้น

วิธีทดลอง ใช้หนูเม้าส์ เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม แบ่งหนูเป็นกลุ่มด้วยวิธีสุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว หนูแต่ละตัวจะถูกใส่ไว้ใน Plexiglass restrainer ที่สามารถให้หางหนูลอดออกมาได้ ระบายหางหนูด้วยสีดำให้มีขนาด 1 เซนติเมตรที่ตำแหน่ง 4 เซนติเมตรจากปลายหาง นำหางหนูมาวางลงบน Tail-flick analgesic meter ซึ่งตั้งความเข้มของแสงคงที่ที่ 3.7 °A ให้ตำแหน่งที่แสงส่องผ่านอยู่ตรงกลางของส่วนที่ทำเครื่องหมายไว้ สังเกต

และบันทึกเวลาที่หนูสะดุ้งหนีออกจากแสง โดยมี cut-off time ที่ 4 วินาที ทำ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 10 นาที (หนูตัวที่มี pre-drug baseline มากกว่า 4 วินาทีจะถูกตัดออกจากการทดลอง เนื่องจาก การที่หนูทดลองที่สามารถสะดุ้งหนีออกจากแสงมี pre-drug baseline มากกว่าค่า cut-off time ที่ 4 วินาที อาจเกิดจากพฤติกรรมของหนูทดลองนั้นที่สามารถทนต่อความปวดได้มาก ตัวกระตุ้นด้วยความร้อนที่ทางไม่สามารถกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดและเกิดการตอบสนองต่อความเจ็บปวดได้ เมื่อให้สารทดสอบหนูทดลองอาจยังคงสามารถสะดุ้งหนีออกจากแสงโดยใช้เวลานานใกล้เคียงกับค่า cut-off time ที่ 4 วินาทีด้วย ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถสรุปผลการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดได้ที่เกิดจากสารทดสอบหรือไม่ โดยการแปลผลการทดสอบจะหาค่า %MPE ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลา) จากนั้นให้สารทดสอบ ในขนาดต่าง ๆ 5 ความเข้มข้น ยาระงับปวดมาตรฐาน (morphine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) หรือ vehicle ทางช่องท้อง แล้วทำการทดสอบ post-drug latency ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาทีหลังให้ยา

วิธีคำนวณ หาค่า Test latency (TL) ของหนูแต่ละตัว โดยค่า

$$\text{Mean of Baseline TL} = (\text{TL ครั้งที่ 2} + \text{TL ครั้งที่ 3}) / 2$$

แปลผลเป็น % MPE (percent maximum possible effect) ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลาโดย

$$\% \text{ MPE} = [(\text{TL หลังได้รับสารทดสอบ} - \text{baseline TL}) / (\text{cut-off time} - \text{baseline TL})] \times 100$$

ค่า Cut-off time = 4 วินาที

คำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC) ของแต่ละกลุ่ม พื้นที่ใต้กราฟที่ได้คือ Area of analgesia

สำหรับ Mean of Baseline Test Latency สามารถคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ Test Latency ครั้งที่สองและครั้งที่สาม จากการทดสอบ pre-drug baseline สามครั้ง โดยครั้งที่หนึ่งจะเป็นการปรับให้หนูทดลองมีความคุ้นเคยกับสภาวะของการทดลองก่อน จึงไม่นำค่า Test Latency ครั้งที่หนึ่งมาคำนวณด้วย)

การศึกษาใน Mouse tail-flick method ประกอบด้วย การศึกษา dose-response curve ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมชันเฮซานอล ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในแต่ละการทดลอง แบ่งหนูออกเป็น 12 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ใช้หนูจำนวน 120 ตัวต่อ 1 การทดลองย่อย โดยทำการแบ่งกลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จัดเป็นกลุ่มควบคุม ให้ตัวทำละลาย

กลุ่มที่ 2 ให้ยาระงับปวดมาตรฐาน (morphine 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)

กลุ่มที่ 3-7 ให้สารสกัดหอมแดงเพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 8-12 ให้สารสกัดกระเทียมเพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ขนาดตั้งแต่ 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

3.2.3 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบจากสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7

3.2.3.1 การเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ Murine macrophage (RAW 264.7) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มี CO₂ 5%, 37 °C

3.2.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT reduction assay (Mossmann, 1983)

หลักการ เอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิตสามารถเปลี่ยน MTT ซึ่งเป็นสาร tetrazolium salt (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นผลึกสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ (violet formazan crystal) เมื่อละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นของการดูดกลืนแสงจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยสามารถตรวจวัดการดูดกลืนแสงของ formazan ที่ 570 นาโนเมตร

ทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ให้มีจำนวน 10⁴ cells/well ใน 96 well plate แล้ว incubate ใน CO₂ incubator, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.250 และ 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้ว incubate ใน CO₂ incubator, 5% CO₂, 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

และเติมสาร MTT วัดสี formazan ที่เกิดจากการทำงานของ mitochondrial dehydrogenases ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการรอดชีวิตของเซลล์ โดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ 570 นาโนเมตรทำซ้ำ 3 ครั้ง

(หมายเหตุ สำหรับการทดสอบ MTT จาก preliminary study ในโครงการ NRCT-JSPS joint research program เป็นการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยศึกษาผลของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการทดลองโดยคัดกรองเบื้องต้น จึงมีจำนวนการทดลองไม่เพียงพอ จึงต้องการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมที่เหมาะสม ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ใหม่เพื่อใช้ในการทดสอบต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่อไป)

3.2.3.3 การศึกษาผลสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

วิธีการและขั้นตอนการสกัด RNA และ reverse transcription-polymerase chain reaction

1. Split cell ความเข้มข้น 10^6 cells/ml ปริมาตร 1 ml ลงใน 12 well plate จากนั้น incubated เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติมสารทดสอบ ความเข้มข้นที่กำหนด incubated เป็นเวลา 22 ชั่วโมง
3. กระตุ้นด้วย *E. coli* LPS แล้ว incubated ต่ออีก 2 ชั่วโมง
4. เก็บ และสกัด RNA โดยใช้ RNA extraction kit (GE Healthcare, UK) และใช้วิธีการสกัดตามที่ระบุมาในชุดสกัด ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก และตามด้วยการทำให้ชิ้นส่วนของเซลล์ที่แตกนั้นมีขนาดลดลง และเมื่อใช้ Column ที่สามารถจับกับ RNA ได้ total RNA จะจับอยู่บริเวณ Column นี้ จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ต่างๆ และกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย DNase enzyme สุดท้ายล้าง RNA ที่ได้ออกจาก Column โดยใช้น้ำที่ไม่มี RNase วัดปริมาณ total RNA ที่ได้ด้วย UV spectrophotometer ที่ 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณ total RNA ที่ได้ โดยใช้สูตร

$$\text{Concentration of RNA sample} = 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{dilution factor}$$

ใช้ Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany) เปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งใช้ปริมาณ RNA เริ่มต้น 40 ng แล้วตรวจหาปริมาณของ β -actin, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งใช้ cDNA เริ่มต้น 3 μ l โดยใช้ primer สำหรับ β -actin, iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ดังแสดงในตารางที่ 1 เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเครื่อง thermal cycler PCR แต่ละยีนใช้ 27 รอบในการเพิ่มปริมาณซึ่งระบบที่ใช้ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-1 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR

| Genes | Primer | Sequence : (5'-3') | Expected sizes (bp) | References |
|----------------|---------|-----------------------------|---------------------|------------------------|
| β -actin | Forward | TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT | 285 | Won et al. (2006) |
| | Reverse | CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG | | |
| iNOS | Forward | AATGGCAACATCAGGTCGGCCATCACT | 454 | Won et al. (2006) |
| | Reverse | GCTGTGTGTACAGAAGTCTCGAACTC | | |
| IL-1 β | Forward | CAGGATGAGGACATGAGCACC | 447 | Sugawara et al. (2003) |
| | Reverse | CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC | | |
| IL-6 | Forward | CATCCAGTTGCCTTCTTGGA | 463 | Sugawara et al. (2003) |
| | Reverse | GCATTGGAATTGGGGTAGGAAG | | |
| TNF- α | Forward | ATGAGCACAGAAAGCATGATC | 276 | Won et al. (2006) |
| | Reverse | TACAGGCTTGTCACTCGAATT | | |
| COX-2 | Forward | GGAGAGACTATCAAGATAGT | 861 | Won et al. (2006) |
| | Reverse | ATGGTCAGTAGACTTTTACA | | |
| COX-1 | Forward | AGTGCGGTCCAACCTTATCC | 382 | Won et al. (2006) |
| | Reverse | CCGCAGGTGATACTGTCGTT | | |

ตารางที่ 3-2 ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA

| Genes | Denaturation / RT Inactivation | For Cycles | | | Final Extension | Hold |
|----------------|--------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|------|
| | | Denaturation | Annealing | Extension | | |
| β -actin | 95 °C, 2 min | 94 °C, 1 min | 60 °C, 1 min | 72 °C, 1 min | 72 °C, 10 min | 4 °C |
| iNOS | 95 °C, 2 min | 95 °C, 1 min | 60 °C, 1 min | 72 °C, 1.5 min | | |
| COX-2 | 95 °C, 2 min | 94 °C, 1 min | 60 °C, 1 min | 72 °C, 1 min | | |
| COX-1 | 95 °C, 2 min | 94 °C, 1 min | 55 °C, 1 min | 72 °C, 1 min | | |
| TNF- α | 94 °C, 2 min | 94 °C, 15 Sec | 60 °C, 1 min | 72 °C, 1 min | | |
| IL-1 β | 94 °C, 2 min | 94 °C, 45 Sec | 60 °C, 45 Sec | 72 °C, 1 min | | |
| IL-6 | 94 °C, 2 min | 94 °C, 15 Sec | 60 °C, 1 min | 72 °C, 1 min | | |

ทำตรวจสอบ RT-PCR products ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บน 1.5% Agarose gel ใช้ TAE buffer 1X เป็นตัวทำละลาย วัดความเข้มของแถบ products โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ Novel Juice (GeneDirex) กับ DNA และสามารถเรืองแสงได้เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง Gel Documentation InGenius L (Gel Documentation and Analysis system) เพื่อแสดงถึงระดับการแสดงออกของ iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β IL-6 และ β -actin จากนั้นคำนวณเป็นปริมาณการแสดงออกของยีนโดยคิดเป็นสัดส่วน (relative ratio) กับ mRNA ของ β -actin ที่ใช้เป็น internal standard ทำการศึกษาซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยวิธี Folin-Ciocalteus (Singleton and Rossi, 1965)

หลักการ สารในกลุ่มฟีนอลสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสาร Folin-ciocalteu reagent เกิดสารสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถดูดกลืนแสง UV-Visible ที่ ความยาว คลื่น 765 นาโนเมตร ทำการหาปริมาณของสารฟีนอลรวม (total phenolic compounds) เทียบเท่ากับปริมาณของกรดแกลลิก (gallic acid monohydrate) ซึ่งใช้เป็นสารฟีนอลมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย 20% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

ใช้ Sodium carbonate anhydrous 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร.

การเตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid stock solution

เตรียม Gallic acid stock solution ด้วยการละลาย Gallic acid 125 มิลลิกรัมใน 95% เอทานอล, ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร ได้สารละลาย Gallic acid stock solution ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.

การเตรียมสารละลายฟีนอลมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ทำได้โดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลาย Gallic acid stock solution ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร. ในปริมาตรต่างๆ ดังตารางที่ 3-3 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตรจะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3-3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม

| หลอดที่ | ความเข้มข้นของสารละลาย Gallic acid (mg/ml) | ปริมาตรที่เตรียมมาจาก Gallic acid stock solution (µl) |
|---------|---|--|
| 1 | 0.05 | 100 |
| 2 | 0.10 | 200 |
| 3 | 0.15 | 300 |
| 4 | 0.20 | 400 |
| 5 | 0.25 | 500 |
| 6 | 0.30 | 600 |

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลาย Gallic acid ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองทั้งหมด 6 หลอด
2. เติม Folin-Ciocalteu reagent 700 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 7 มิลลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที
3. เติม 20% Sodium carbonate ปริมาตร 3.5 มิลลิตรโดยทิ้งให้ตกตะกอนแล้วเติมเฉพาะส่วนใสลงไปในแต่ละหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายฟีนอลมาตรฐานความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิตรเป็นสารเปรียบเทียบ (blank)
5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดหอมแดงและกระเทียม

เตรียมตัวอย่างสารละลายหอมแดงและกระเทียม โดยละลายสารสกัดหยาบหอมแดง 40 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายหอมแดงเท่ากับ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และละลายสารสกัดหยาบกระเทียม 400 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายกระเทียมเท่ากับ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างหอมแดงและกระเทียมปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้น เติมสารต่างๆ เหมือนกับการสร้างกราฟมาตรฐาน คือ เติม Folin-Ciocalteu reagent 700 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 20% Sodium carbonate 3.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

การคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลรวม

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic acid จะได้สมการเส้นตรง. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง นำมาคำนวณในสมการ เส้นตรงที่ได้ จะได้ปริมาณของสารฟีนอลรวมที่มีในสารตัวอย่างแต่ละชนิดในรูปมิลลิกรัมของ Gallic Acid Equivalent (GAE) โดยคิดเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดจำนวน 1 กรัม

3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม (Pourmorad et al., 2006)

หลักการ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถเกิดปฏิกิริยากับสาร Aluminium chloride และ Potassium acetate เกิดสารที่สามารถดูดกลืนแสง UV-Visible ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการหาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์รวม เทียบเท่าเป็นปริมาณของ Quercetin ซึ่งใช้เป็นสารฟลาโวนอยด์มาตรฐาน

การเตรียม 10% Aluminium chloride

เตรียมโดยละลาย Aluminium chloride 1 กรัมใน methanol 10 มิลลิลิตร

การเตรียม 1 M Potassium acetate

เตรียมโดยละลาย Potassium acetate 0.9814 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin

เตรียม Quercetin stock solution ด้วยการละลาย Quercetin dihydrate 7.8125 มิลลิกรัม

(เท่ากับ Quercetin 5 มิลลิกรัม) ใน methanol แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้ Quercetin stock solution ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเตรียมจาก Quercetin stock solution ในปริมาตรต่างๆ ดังตารางที่ 3-4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3-4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

| หลอดที่ | ความเข้มข้นของสารละลาย Quercetin($\mu\text{g/ml}$) | ปริมาตรที่เตรียมมาจาก Quercetin stock solution (ml) |
|---------|---|--|
| 1 | 20 | 1 |
| 2 | 40 | 2 |
| 3 | 60 | 3 |
| 4 | 80 | 4 |
| 5 | 100 | 5 |

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปิดสารละลาย Quercetin ปริมาตร 600 ไมโครลิตรในแต่ละความเข้มข้น ลงในหลอดทดลองทั้งหมด 5 หลอด
2. เติม methanol 3.4 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน
3. เติม 10% Aluminium chloride และ 1 M Potassium acetate อย่างละ 200 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 5.6 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็นสารเปรียบเทียบ (blank)
5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Quercetin กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

การตรวจวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหอมแดงและกระเทียม

เตรียมตัวอย่างสารละลายหอมและกระเทียม โดยละลายสารสกัดหยาบหอมแดง 200 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้นของสารละลายหอมแดงเท่ากับ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และละลายสารสกัดหยาบกระเทียม 400 มิลลิกรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้นของสารละลายกระเทียมเท่ากับ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากนั้น ปิเปตสารละลายตัวอย่าง หอมแดงและกระเทียมปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้น เติมน้ำต่าง ๆ เหมือนกับการสร้างกราฟมาตรฐาน คือเติม methanol 3.4 มิลลิลิตรเข้าไปให้เข้ากัน เติมน้ำ 10% Aluminium และ 1 M Potassium อย่างละ 200 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่น 5.6 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็นสารเปรียบเทียบ

การคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Quercetin จากสมการเส้นตรง. จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่วัดได้ ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Quercetin คำนวณในสมการเส้นตรงที่ได้ จะได้ปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมหรือ Total flavonoid compounds ที่มีในสารตัวอย่างที่มีในสารตัวอย่างแต่ละชนิดในรูปมิลลิกรัมของ Quercetin Equivalent โดยคิดเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดจำนวน 1 กรัม

3.3. การรายงานผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดใน hot-plate และ tail-flick test การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มในการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ การแสดงออกของยีน β -actin, COX-1, IL-1 β ,

COX-2, TNF- α , IL-6, iNOS รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard error of the means) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ และกลุ่มควบคุม โดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบผลด้วย multiple comparisons ด้วย LSD (Least Significant Difference) statistics พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compound) รายงานผลปริมาณสารฟีนอลรวมที่มีในสารสกัดในรูปค่าเฉลี่ยมิลลิกรัมของ Gallic acid equivalent (GAE) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ต่อสารสกัด 1 กรัม

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid compound) รายงานผลปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมที่มีในสารสกัดในรูปมิลลิกรัมของ Quercetin equivalent \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ต่อสารสกัด 1 กรัม

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทที่ 4

ผลการวิจัย

(Results)

4.1 ผลการเตรียมสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล

เมื่อนำส่วนหัวของหอมแดงและกระเทียมที่ปอกกาบใบออกแล้ว มาป็นย่อยให้มีขนาดเล็กลงและนำมาหมักโดยใช้วิธี Maceration ด้วย 95% เอธานอล แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี Freeze dry เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) สารสกัดหอมแดงจะมีสีน้ำตาลอมแดง มีลักษณะแข็งและเหนียวเล็กน้อย สารสกัดกระเทียมมีสีเหลืองอ่อน มีลักษณะแข็ง เมื่อใช้ช้อนชูด สามารถตักออกจากขวดได้ง่าย ลักษณะของสารสกัดหอมแดงกระเทียม ดังแสดงในรูปที่ 4-1 โดยมี % yield ดังแสดงในตารางที่ 4-1 ซึ่งปริมาณสารสกัดที่ได้มีปริมาณเพียงพอต่อการใช้งานสิ้นสุดการศึกษาผลการวิจัย



หอมแดง - shallot

(*Allium ascalonicum* L.)



กระเทียม - Garlic

(*Allium sativum* L.)

รูปที่ 4-1 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบของหอมแดงและกระเทียมที่ผ่านการทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dryer

ตารางที่ 4-1 แสดงน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง น้ำหนักสารสกัดหยาบ ค่า % yield และลักษณะของสารสกัดหยาบจากส่วนหัวของหอมแดงและกระเทียม

| ข้อมูล | สารสกัดหยาบ จากส่วนหัวของหอมแดง | สารสกัดหยาบ จากส่วนหัวของกระเทียม |
|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| น้ำหนักสมุนไพร (g) | 2237.91 | 1810.62 |
| น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g) | 160.36 | 128.01 |
| ค่า % yield | 7.17 | 7.07 |
| ลักษณะของสารสกัดหยาบ | สีน้ำตาลอมแดง ชั้นหนืดเล็กน้อย | สีเหลืองอ่อน ผงแห้ง |

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมในเอธานอลในสัตว์ทดลอง

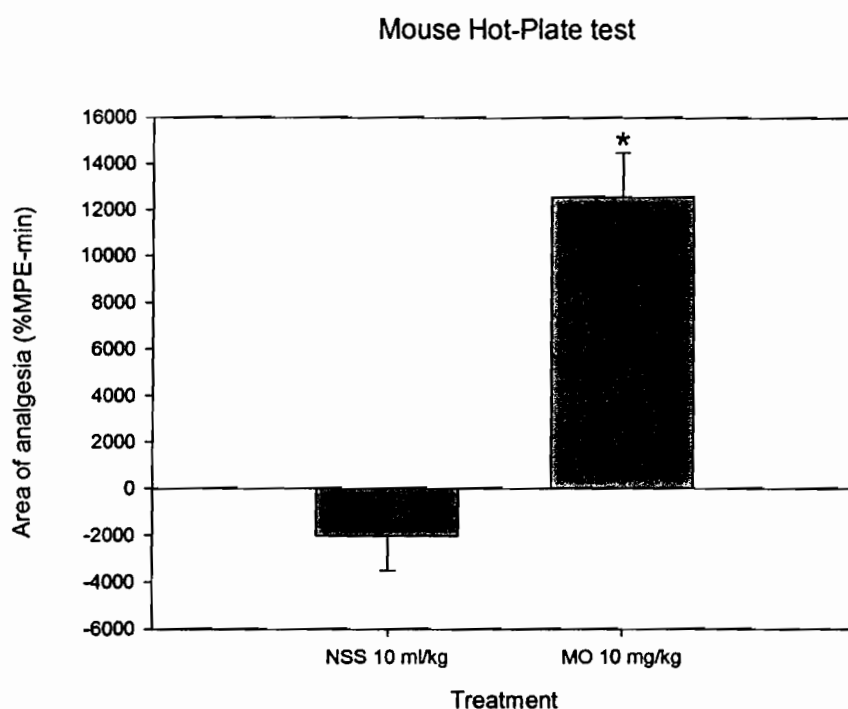
ทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวด (analgesic activity) ของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมในเอธานอลในสัตว์ทดลองหนูถีบจักรเพศผู้ ด้วยวิธี hot plate test และ tail-flick test

4.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรหอมแดงและกระเทียมใน Hot plate test

การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดเปรียบเทียบกับยาระงับปวดมอร์ฟีน (Morphine sulfate) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยทำการทดสอบในหนูถีบจักรเพศผู้ที่ได้รับยามอร์ฟีนและสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ในขนาด 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี hot plate test ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 55 ± 0.5 องศาเซลเซียส ครอบด้วยแก้วใส โดยมี cut-off time ที่ 45 วินาทีเพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง สังเกตพฤติกรรมการเลียอุ้งเท้าหลัง หรือการกระโดดอย่างรุนแรง บันทึกเวลาที่สัตว์ทดลองแสดงพฤติกรรมนั้น โดยทำการทดสอบ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 10 นาที (การคำนวณ Mean of Baseline Test Latency คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ Test Latency ครั้งที่สองและครั้งที่สาม จากการทดสอบ pre-drug baseline สามครั้ง โดยครั้งที่หนึ่งจะเป็นการปรับให้หนูทดลองมีความคุ้นเคย

กับสภาวะของการทดลองก่อน จึงไม่นำค่า Test Latency ครั้งที่หนึ่งมาคำนวณด้วย) และ post-drug latency ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90 , 120 และ 240 นาทีหลังให้ยาเพื่อคำนวณหาค่า percent maximum possible effect และพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC) ของแต่ละกลุ่ม

ผลการทดลองพบว่า หนูถีบจักรกลุ่มควบคุมที่ได้ตัวทำละลาย Normal saline (NSS ; solvent control) มีค่า Area of analgesia เท่ากับ -2033.28 ± 1464.86 % Maximum possible effect-minute (% MPE-min) และหนูถีบจักรได้รับยาระงับปวด Morphine ในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่า Area of analgesia เท่ากับ 12555.32 ± 1933.79 %MPE-min แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-2



รูปที่ 4-2 Mouse Hot-Plate Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และมอร์ฟีน (morphine sulfate; 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว

* $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ NSS

ในการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในการระงับปวดใน mouse hot-plate test พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ขนาด 100, 300, 600, 900 และ 1200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่า Area of analgesia (%MPE-min) ดังแสดงในตารางที่ 4-2 ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ Normal Saline ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4-2 Mouse Hot-Plate Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล (100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว

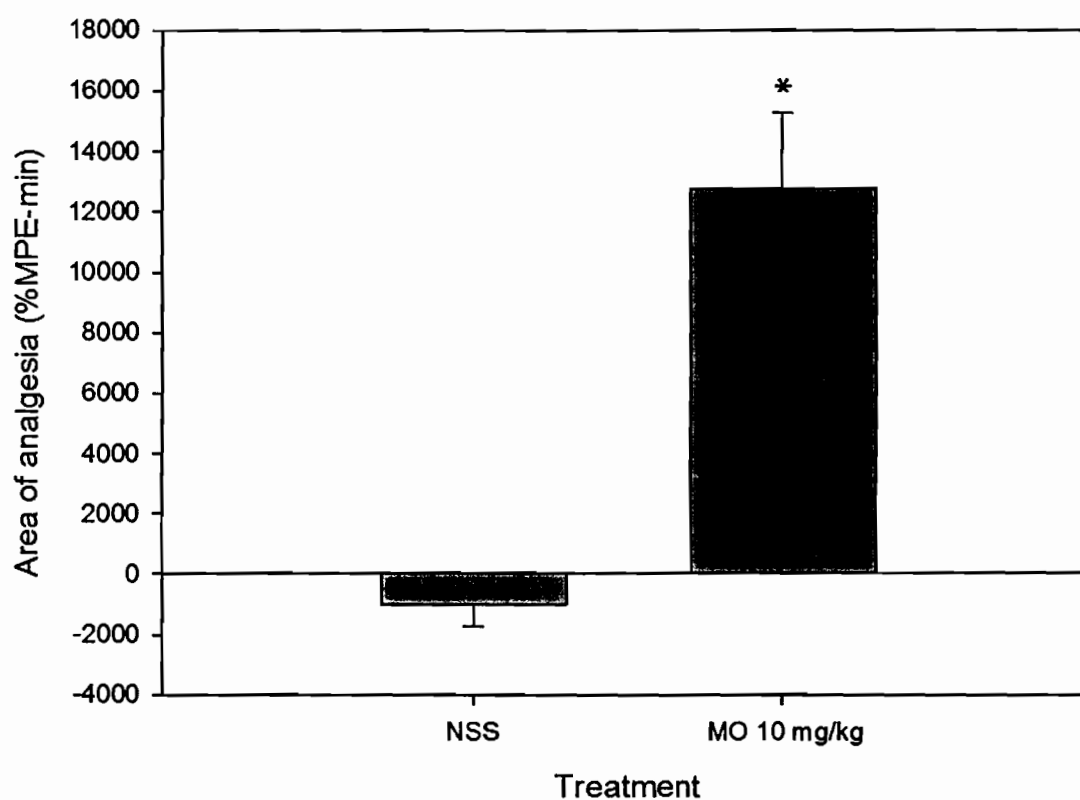
| สารทดสอบ | Area of analgesia \pm Standard error of mean (% MPE-min \pm SE) |
|--|---|
| Normal Saline | -3145.38 \pm 1960.80 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -5419.93 \pm 2506.58 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -289.60 \pm 1476.19 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | 148.35 \pm 2279.37 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | 2369.63 \pm 3738.60 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -2372.66 \pm 1082.34 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -5306.35 \pm 1426.90 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -1306.09 \pm 3171.28 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -4073.63 \pm 2662.24 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -4301.13 \pm 1998.34 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -2320.96 \pm 1017.41 |

4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดสมุนไพรรวมแดงและกระเทียมใน Tail-Flick test

การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดเปรียบเทียบกับยาระงับปวดมอร์ฟีน (Morphine sulfate) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยทำการทดสอบในหนูถีบจักรเพศผู้ที่ได้รับยามอร์ฟีนและสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ในขนาด 100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี Tail-flick test โดยนำหนูที่เตรียมไว้สำหรับการทดลองที่ใส่ไว้ใน Plexiglass restrainer มาทดสอบ นำทางหนูมาวางลงบน Tail-flick analgesic meter ซึ่งตั้งความเข้มของแสงคงที่ที่ 3.7 °A ให้ตำแหน่งที่แสงส่องผ่านอยู่ตรงกลางของส่วนที่เท้าเครื่องหมายไว้ สังเกตและบันทึกเวลาที่หนูสะบัดหางออกจากแสง โดยมี cut-off time ที่ 4 วินาที เพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง ทำ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 10 นาที (การคำนวณ Mean of Baseline Test Latency คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ Test Latency ครั้งที่สองและครั้งที่สาม จากการทดสอบ pre-drug baseline สามครั้ง โดยครั้งที่หนึ่งจะเป็นการปรับให้หนูทดลองมีความคุ้นเคยกับสถานะของการทดลองก่อน จึงไม่นำค่า Test Latency ครั้งที่หนึ่งมาคำนวณด้วย) และ post-drug latency ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90 , 120 และ 240 นาทีหลังให้ยาเพื่อคำนวณหาค่า percent maximum possible effect และพื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC) ของแต่ละกลุ่ม

ผลการทดลองพบว่า หนูถีบจักรกลุ่มควบคุมที่ได้ตัวทำละลาย Normal saline (NSS ; solvent control) มีค่า Area of analgesia เท่ากับ -1000.39 ± 721.66 % MPE-min และหนูถีบจักรได้รับยาระงับปวด Morphine ในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่า Area of analgesia เท่ากับ 12751.35 ± 2523.79 %MPE-min แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-3

Mouse Tail - Flick test



รูปที่ 4-3 Mouse Tail-Flick Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และมอร์ฟีน (morphine sulfate; 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว

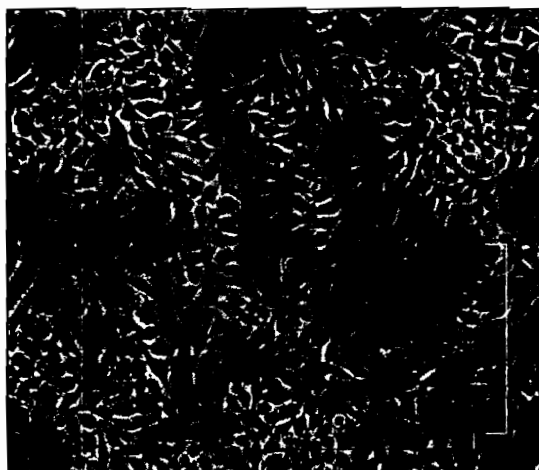
* $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ NSS

ในการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมและฤทธิ์ในการระงับปวดใน mouse tail-flick test พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล ขนาด 100, 300, 600, 900 และ 1200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่า Area of analgesia (%MPE-min) ดังแสดงในตารางที่ 4-3 ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ Normal Saline ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4-3 Mouse Tail-Flick Test แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ Area of analgesia (%MPE-min) ในช่วง 0-240 นาที หลังจากฉีด normal saline solution (NSS) และสารสกัดหอมแดงในเอธานอล (100 – 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง แต่ละกลุ่มใช้หนูจำนวน 10 ตัว

| สารทดลอง | Area of analgesia ± Standard error of mean (% MPE-min) ± (SE) |
|--|---|
| Normal Saline | -1000.39 ± 721.66 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | 509.10 ± 897.00 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -4546.03 ± 2693.52 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -2244.52 ± 1798.39 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -5612.02 ± 3173.41 |
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | -7988.20 ± 5928.62 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | 59.44 ± 837.24 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | 850.00 ± 1166.80 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | 1720.67 ± 669.03 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | 1547.03 ± 735.67 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล 1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว | 2256.36 ± 1397.03 |

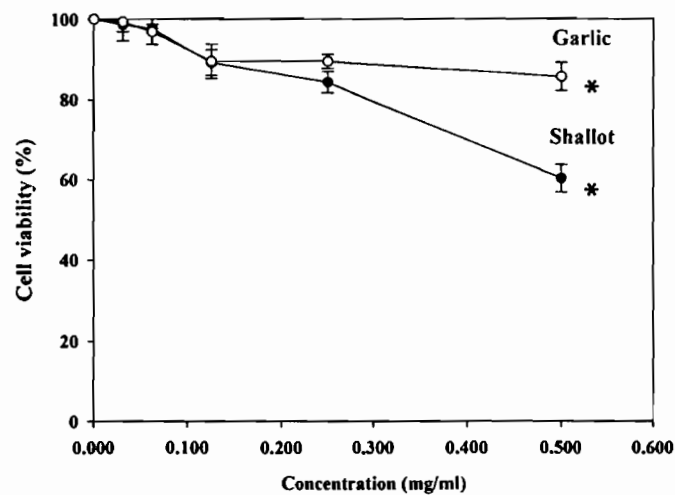
4.3 ผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบจากสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7



รูปที่ 4-4 ลักษณะเซลล์ Murine macrophage RAW 264.7 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

4.3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมด้วย MTT Test

ลักษณะของเซลล์ RAW 264.7 ที่ใช้ในการศึกษามีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4-4 ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยการ incubate เซลล์กับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (0.03125, 0.0625, 0.125, 0.250 และ 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดค่า cell viability โดยใช้ MTT assay เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุดที่สามารถใช้ในการทดสอบในการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยที่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เซลล์นี้มีการรอดชีวิตลดลง (cell viability) เท่ากับ 60.31% และ 85.74% ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ได้รับและร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ รูปที่ 4-5 ทั้งนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ ($P < 0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองชนิดที่เลือกใช้ในการศึกษาต่อไปคือ 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 4-5 ผลของสารสกัดสารสกัดหอมแดง (Shallot) และสารสกัดกระเทียม (Garlic) ที่ความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.250 และ 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อการรื้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 เมื่อทดสอบด้วย MTT Assay (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 การทดลอง, $n = 3$) * แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.3.2 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค RT-PCR

การศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ RAW 264.7 ด้วยวิธี RT-PCR ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS (unstimulated RAW 264.7 cells) และกลุ่มที่ได้รับเฉพาะสารสกัดหอมแดงหรือสารสกัดกระเทียมความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 น้อย ในขณะที่เซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่ามีการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าปริมาณการแสดงออก

ของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ที่คิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ที่ใช้เป็น internal control ในกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และในกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับสารสกัด มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

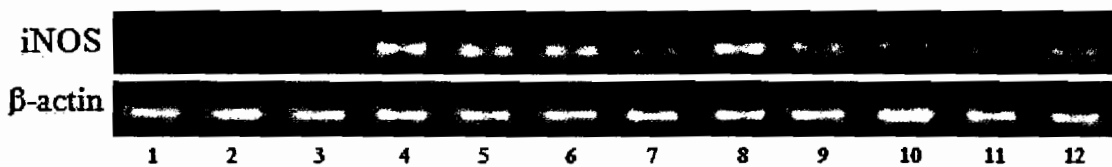
ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำได้โดยการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องที่คิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ที่ใช้เป็น internal control ระหว่างกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวและกลุ่มทดสอบ ได้แก่ กลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ หรือสาร positive control โดยจากการทดลองพบว่า กลุ่มควบคุม เซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS สามารถชักนำให้เซลล์มีการแสดงออกของ iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 mRNA อย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 4-6, 4-8, 4-10, 4-12, 4-14 และ 4-16 ตามลำดับ

สาร Aminoguanidine 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Indomethacin 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็น Positive control groups ในการทดลองสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS ดังแสดงในรูปที่ 4-6, 4-8, 4-10, 4-12, 4-14 และ 4-16 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ที่คิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ระหว่างกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสาร Aminoguanidine 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Indomethacin 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-7, 4-9, 4-13, 4-15 และ 4-17 ตามลำดับ

4.3.2.1 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน iNOS

สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS mRNA ได้ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ iNOS mRNA โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin mRNA กับกลุ่มควบคุม (กลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS) พบว่า

มีฤทธิ์ในการยับยั้ง iNOS mRNA ในลักษณะที่เป็น dose dependent manner ในลักษณะเดียวกัน โดยปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS ที่คิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-6 และ รูปที่ 4-7



รูปที่ 4-6 ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

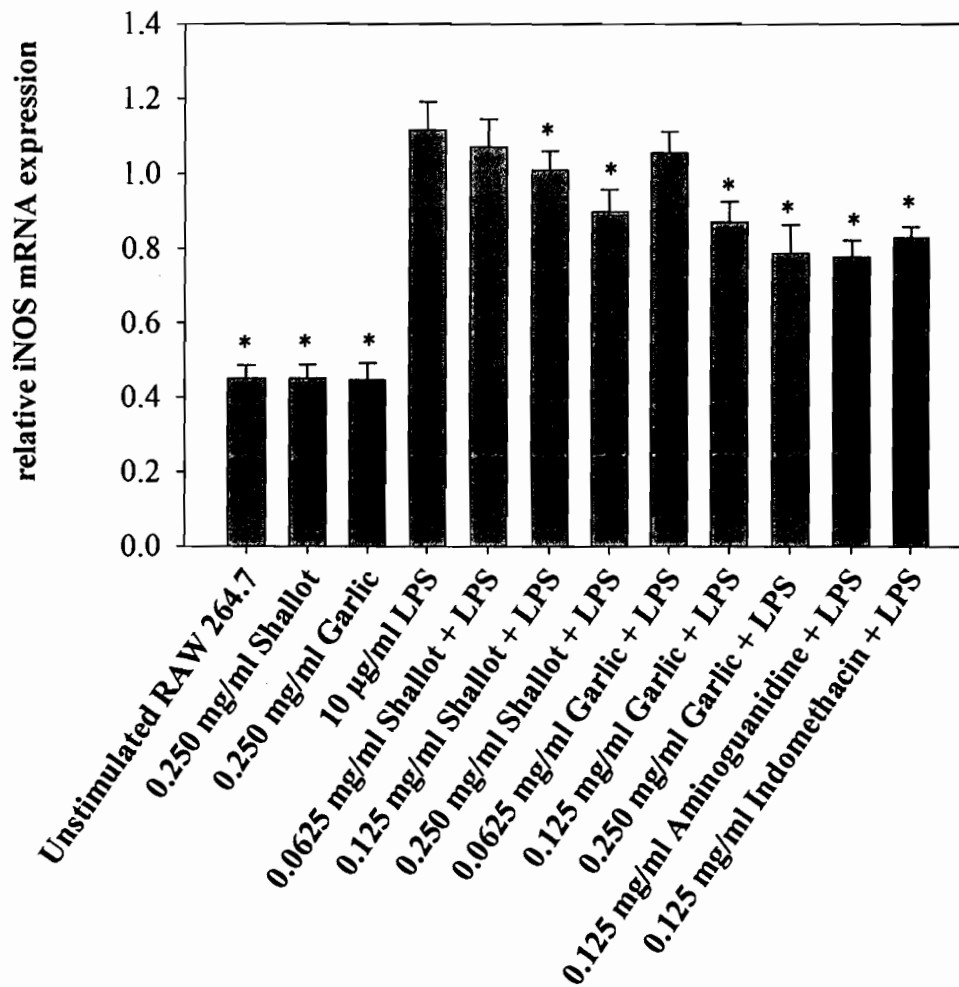
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



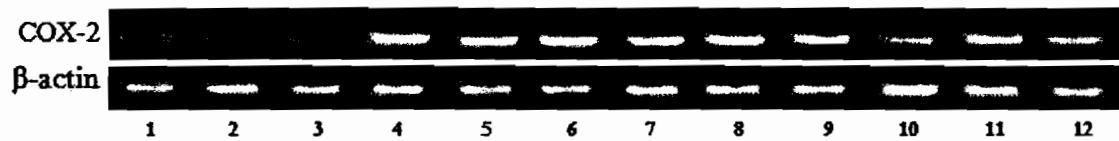
รูปที่ 4-7 ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.3.2.2 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน COX-2

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่ยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สารสกัดกระเทียมในช่วงความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 นี้มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสาร Aminoguanidine 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มที่ได้รับยา Indometacin 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4-8 และ 4-9



รูปที่ 4-8 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

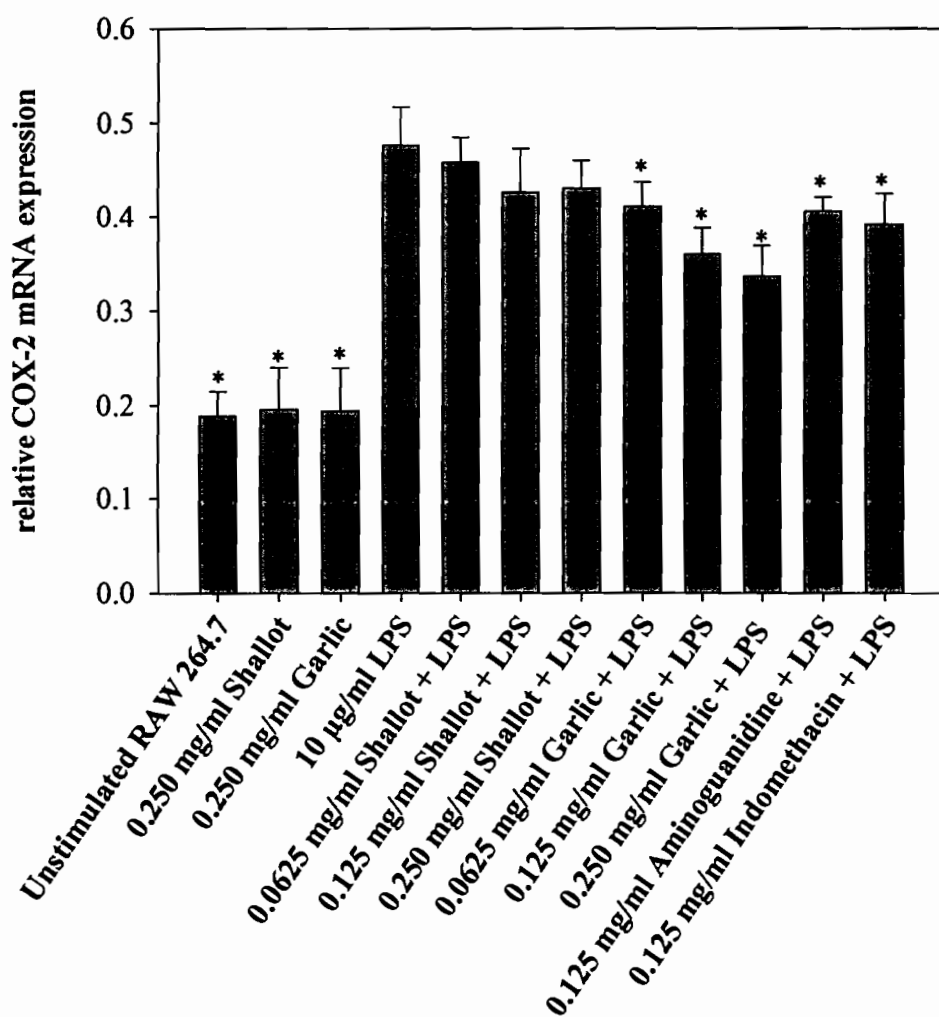
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



รูปที่ 4-9 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

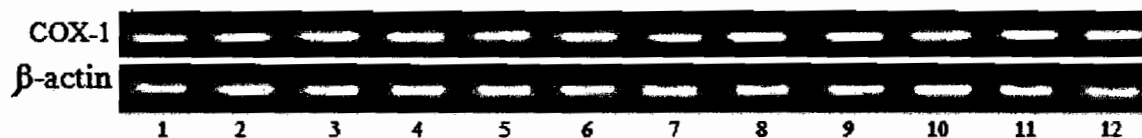
4.3.2.3 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน COX-1

กลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS กระตุ้นเซลล์ให้มีการแสดงออกของยีน COX-1 สูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 ที่คิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS หรือกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม ที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุม เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 4-10 และ 4-11

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-10 และ 4-11

สารสกัดกระเทียมแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 ที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-10 และ 4-11

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 ที่คิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ซึ่งเป็น internal control ระหว่างกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสาร Aminoguanidine 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Indomethacin 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Positive control groups) และกลุ่มควบคุม เซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-10 และ 4-11



รูปที่ 4-10 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

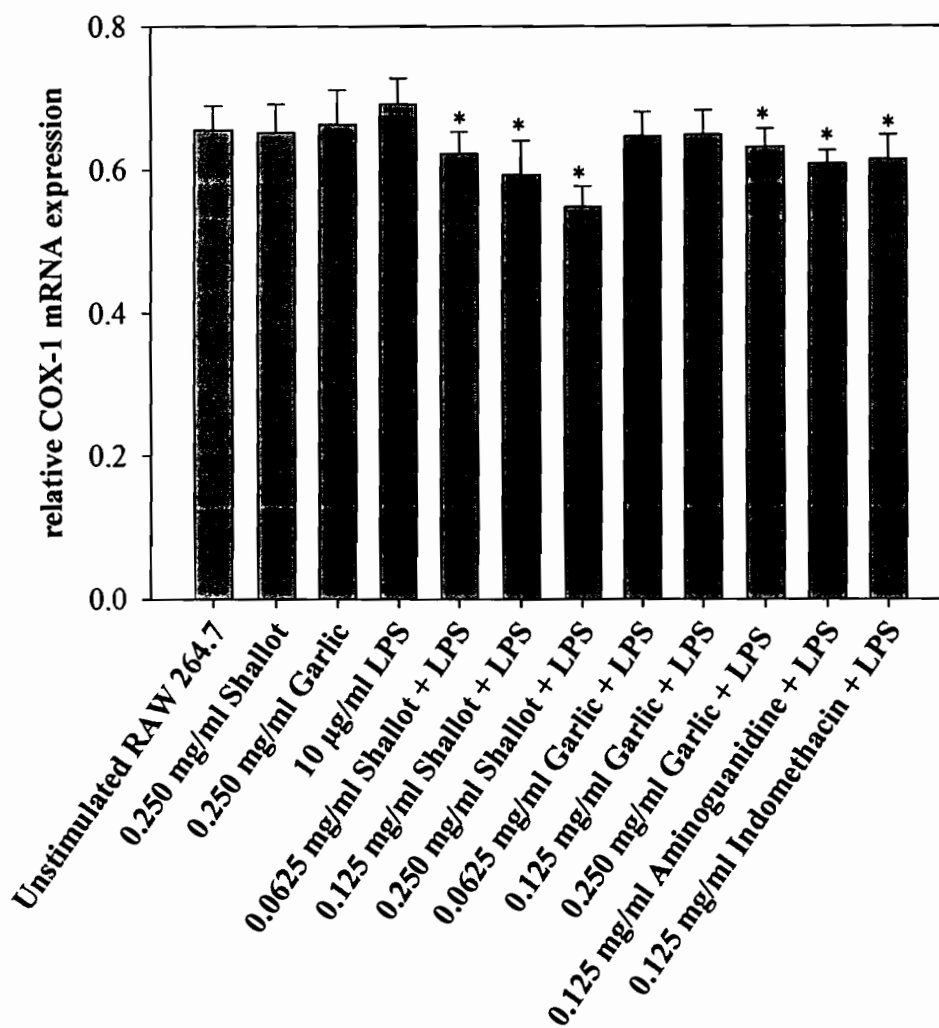
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



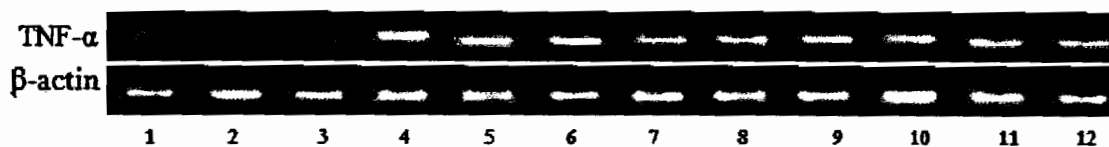
รูปที่ 4-11 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.3.2.4 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน TNF- α

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-12 และ 4-13

สารสกัดกระเทียมแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α ที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α โดยคิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-12 และ 4-13



รูปที่ 4-12 ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

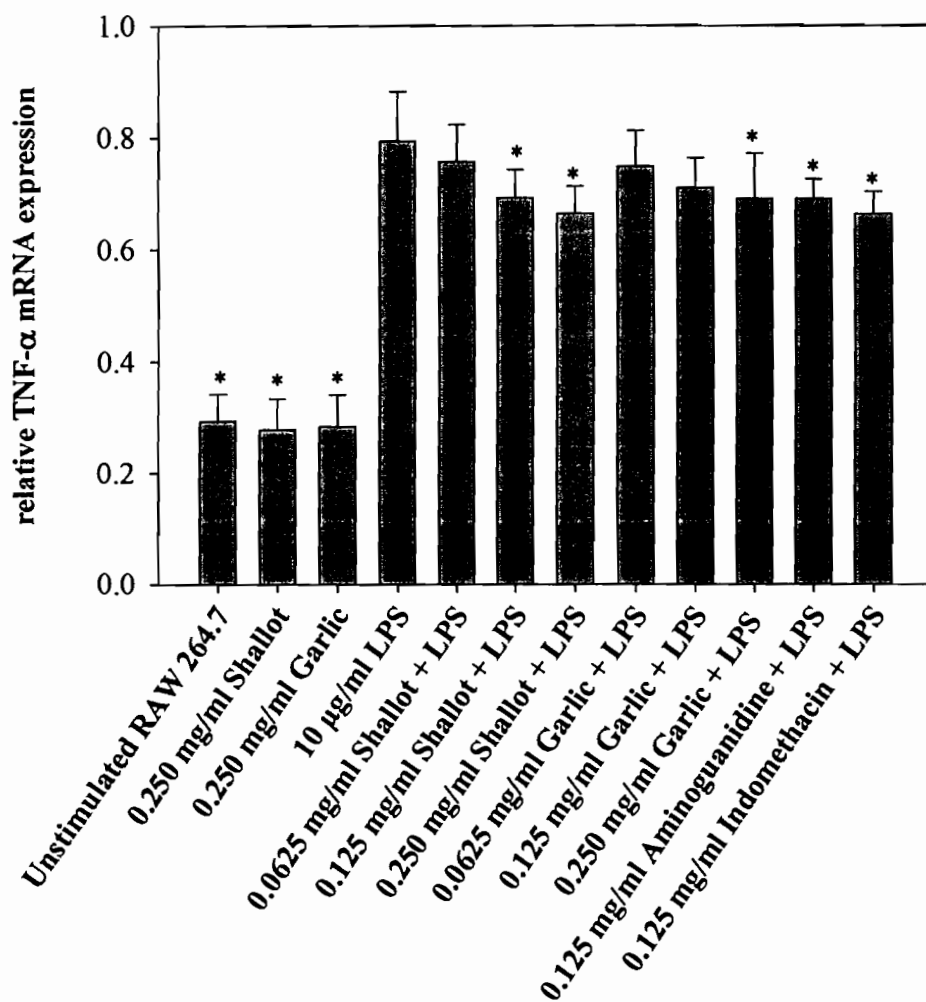
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



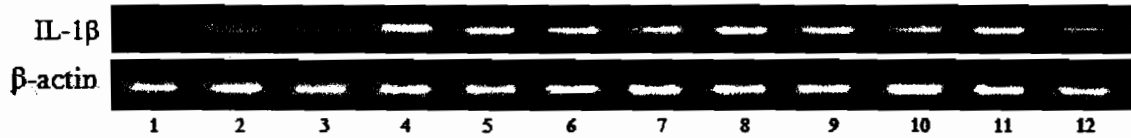
รูปที่ 4-13 ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- α โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.3.2.5 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-14 และ 4-15

สารสกัดกระเทียมในช่วงความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β โดยคิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-14 และ 4-15



รูปที่ 4-14 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

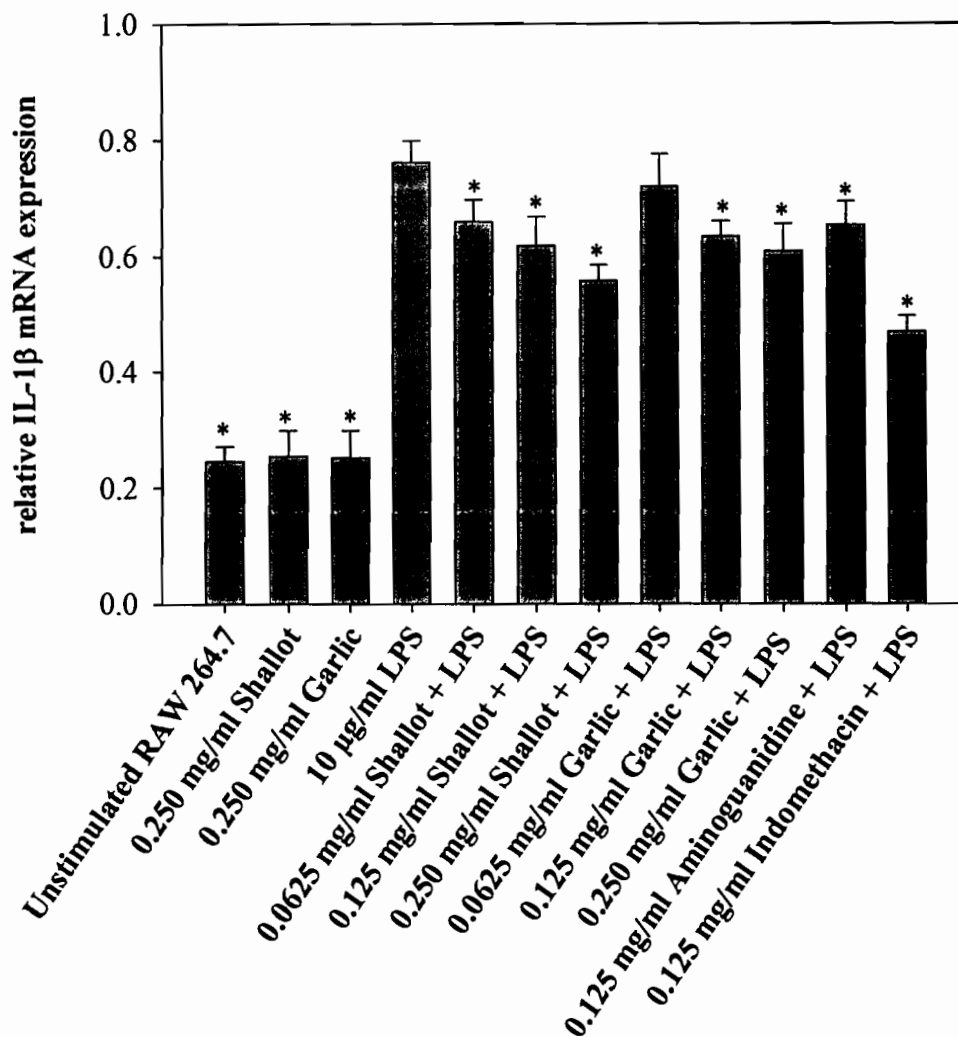
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



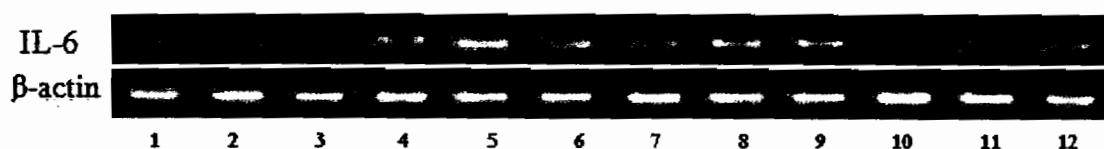
รูปที่ 4-15 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 β โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.3.2.6 ผลของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมต่อการแสดงออกของยีน IL-6

สารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4-16 และ 4-17

สารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625-0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ในลักษณะเป็น dose dependent manner โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับยีน β -actin ของกลุ่มเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้ สารสกัดกระเทียมยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ดีกว่าสารสกัดหอมแดงอีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4-16 และ 4-17



รูปที่ 4-16 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 และ β -actin ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่

1 = Unstimulated RAW 264.7 cells

2 = RAW 264.7 cells และสารสกัดหอมแดง (0.25 mg/ml)

3 = RAW 264.7 cells และสารสกัดกระเทียม (0.25 mg/ml)

4 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS

5 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.0625 mg/ml

6 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.125 mg/ml

7 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดง 0.25 mg/ml

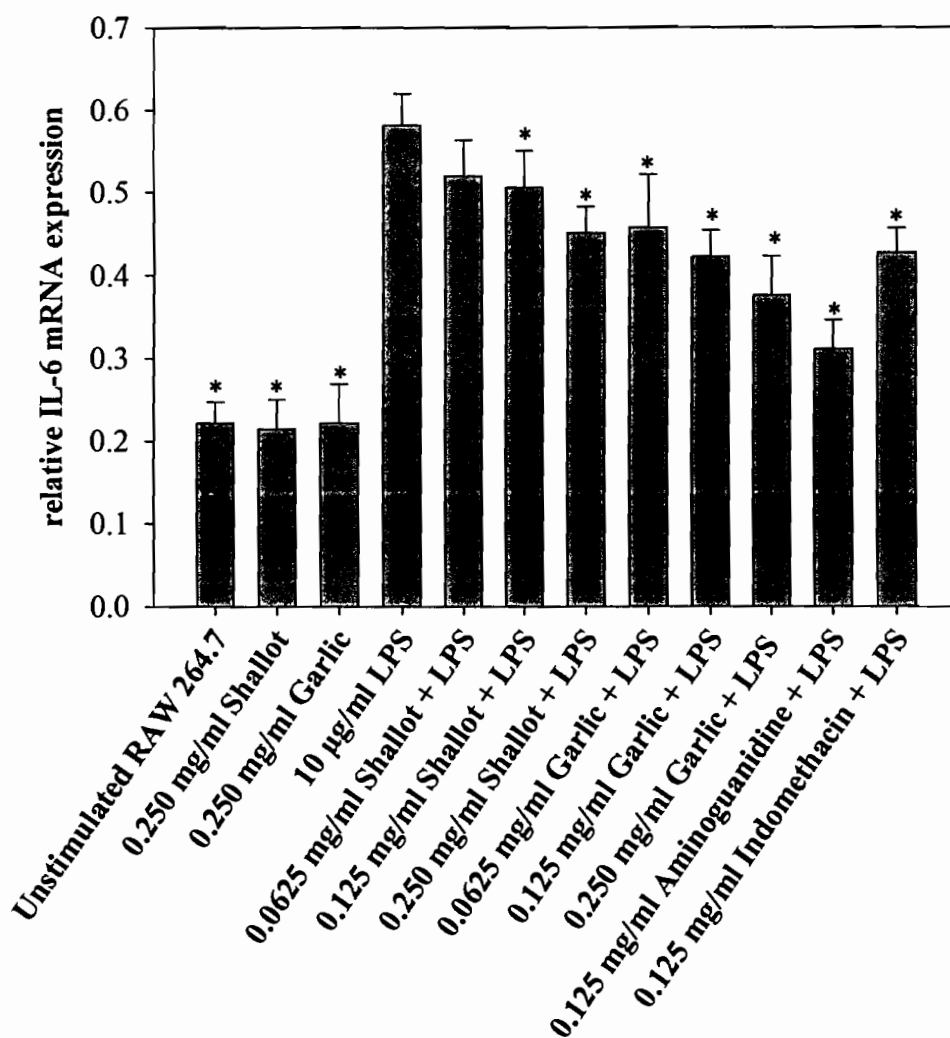
8 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.0625 mg/ml

9 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.125 mg/ml

10 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดกระเทียม 0.25 mg/ml

11 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Aminoguanidine 0.125 mg/ml

12 = RAW 264.7 cells ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับ Indometacin 0.125 mg/ml



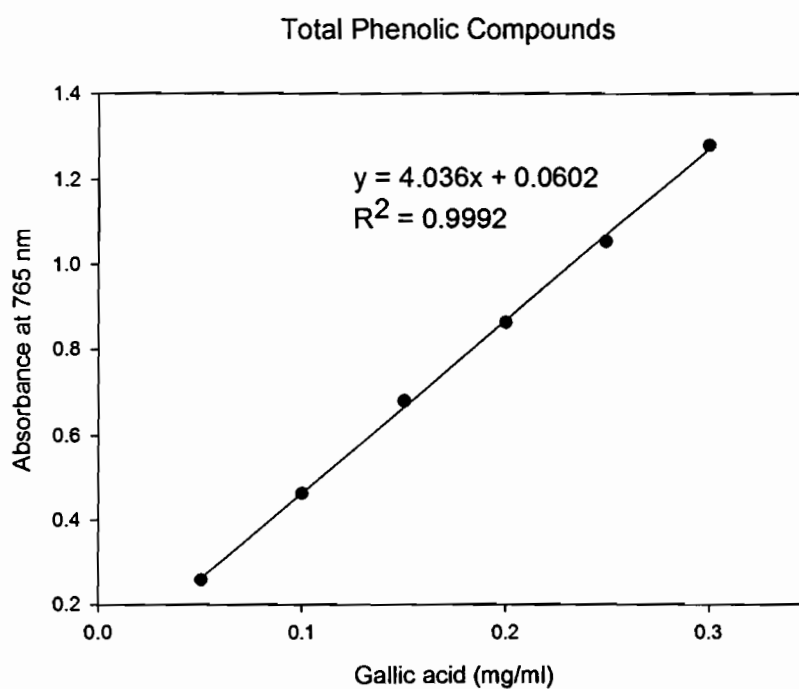
รูปที่ 4-17 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย *E. coli* LPS เมื่อ incubated ร่วมกับสารสกัดจากหอมแดงและสารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (n = 3)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยวิธี Folin-Ciocalteus

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม โดยพิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ในการทดลองนี้ได้เตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent และ Sodium carbonate และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความเข้มข้นของ Gallic acid และได้สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ดังนี้ $y = 4.036x + 0.0602$ ค่า $R^2 = 0.9992$ ดังแสดงในรูปที่ 4-18 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมไปหาปริมาณ Total phenolic compounds โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteus และคำนวณหาปริมาณสมมูลกับ Gallic acid ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหอมแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 15.964 ± 0.122 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 กรัม (n=3) และสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟีนอลรวมเท่ากับ 4.020 ± 0.009 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 กรัม (n=3) ดังแสดงในตารางที่ 4-4

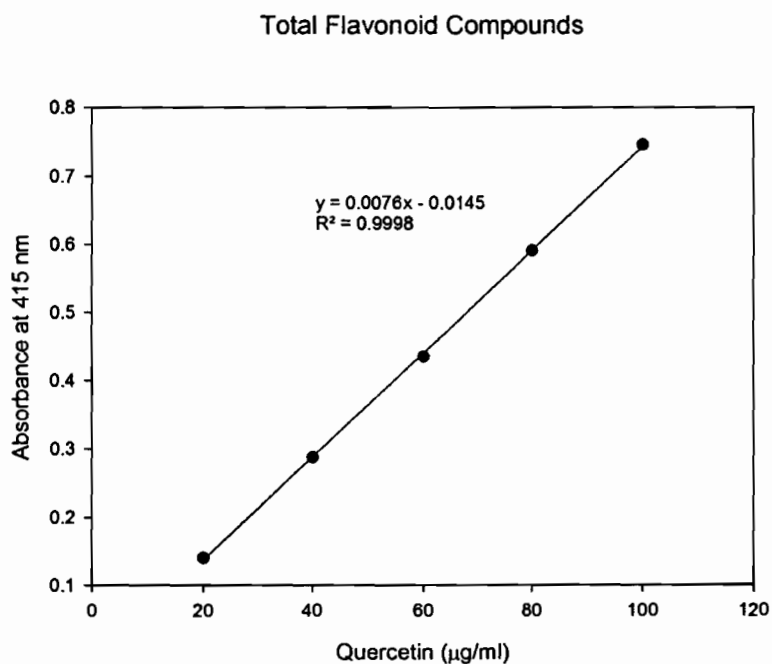
ในที่นี้หมายความว่าถึงใน 1 กรัมของสารสกัดหอมแดงมีปริมาณสารฟีนอลรวมเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Gallic acid ประมาณ 15 มิลลิกรัม และใน 1 กรัมของสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟีนอลรวมเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Gallic acid ประมาณ 4 มิลลิกรัม สารสกัดหอมแดงในเอธานอลมีปริมาณสารฟีนอลรวมสูงกว่าสารสกัดกระเทียมในเอธานอล



รูปที่ 4-18 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหา Total Phenolic Compounds ด้วยวิธี Folin-Ciocalteus

4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียม

การวิเคราะห์หาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมพิจารณาโดยเทียบเท่าเป็นปริมาณของ Quercetin ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน ในการทดลองนี้ได้เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับสาร Aluminium chloride และ Potassium acetate และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของ Quercetin มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความเข้มข้นของ Quercetin และได้สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ดังนี้ $y = 0.0076x + 0.0145$ ค่า $R^2 = 0.9998$ ดังแสดงในรูปที่ 4-19 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมไปหาปริมาณ Total flavonoid compounds คำนวณเป็นปริมาณสมมูลกับ Quercetin ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหอมแดงมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 11.742 ± 0.012 มิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 กรัม (n=3) และสารสกัดกระเทียมมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 7.669 ± 0.038 มิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 กรัม (n=3) ดังแสดงในตารางที่ 4-4



รูปที่ 4-19 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Quercetin ($\mu\text{g/ml}$) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหา Total Flavonoid Compounds

ตารางที่ 4-4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid compounds) ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล

| สารทดสอบ | Total phenolic compounds (มิลลิกรัม/กรัม สารสกัดหยาบ) | Total flavonoid compounds (มิลลิกรัม/กรัม สารสกัดหยาบ) |
|--------------------------|---|--|
| สารสกัดหอมแดงในเอธานอล | 15.964 ± 0.122 | 11.742 ± 0.012 |
| สารสกัดกระเทียมในเอธานอล | 4.020 ± 0.009 | 7.669 ± 0.038 |

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ (Discussion, Conclusion and Suggestions)

5.1 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนหัวของหอมแดงและส่วนหัวของกระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า

สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอทานอล ในขนาด 100-1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ใช้ในการทดสอบไม่มีฤทธิ์ระงับปวดเมื่อทดสอบฤทธิ์ระงับปวดในหนูถีบจักรเพศผู้พันธุ์ ICR ด้วยวิธี Hot-plate และ tail-flick โดยหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมขนาด 100-1200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ทางช่องท้อง ไม่สามารถทนอยู่บนแผ่นร้อนได้นานกว่าและไม่สามารถทนต่อความร้อนได้โดยไม่กระดกหางเมื่อเปรียบเทียบกับหนูถีบจักรกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำเกลือ (Normal saline ,NSS 10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม) ทั้งนี้เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สูงสุดที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้ (% maximum possible effect, %MPE) ที่เวลา 15,30,45,60,90,120 นาทีแล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง %MPE และเวลาพบว่าหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมขนาด 100-1200 มก./กก. ทางช่องท้องมีค่า Area of analgesia ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับยาระงับปวดมาตรฐานมอร์ฟีน ในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว แสดงฤทธิ์ระงับปวด โดยมีค่า Area of analgesia ที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในวิธี Hot-Plate และ Tail-Flick

Mouse Hot-Plate และ Mouse Tail-Flick method เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดในหนูถีบจักร โดยการกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อน ทั้งนี้ตัวกระตุ้นจะทำให้มีการส่งสัญญาณผ่านตัวรับรู้ความเจ็บปวดผ่านไขสันหลังไปสู่สมองและแสดงออกเป็นพฤติกรรมที่ตอบสนองต่อความเจ็บปวด ใน Hot-Plate test หนูที่ได้รับสารทดสอบและสามารถทนต่อการยืนบนแผ่นร้อนได้นานกว่ากลุ่มควบคุมจะถือว่าสารทดสอบนั้นมี

ฤทธิ์ระงับปวดที่ระดับเหนือไขสันหลัง (Supraspinal level) ใน Tail-Flick test หนูที่ได้รับสารทดสอบและสามารถทนต่อการกระตุ้นด้วยความร้อนที่บริเวณหางโดยไม่กระดกหางออกจากแสงนานกว่ากลุ่มควบคุมจะถือว่าสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ระงับปวดที่ระดับไขสันหลัง (Spinal level) (Barrot, 2012) จากการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดพบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลไม่แสดงฤทธิ์ระงับปวดในทั้งสองวิธีการทดสอบนี้ สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลไม่มีฤทธิ์ระงับปวดแบบเฉียบพลันที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนและไม่ออกฤทธิ์ระงับปวดที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนในระบบประสาทส่วนกลาง สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่ใช้ในการศึกษาอาจออกฤทธิ์ระงับปวดโดยออกฤทธิ์ผ่านระบบประสาทส่วนปลายโดยอาจยับยั้งการหลั่งของสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Owoyele และคณะ (2006) ทำการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัด ในเมธานอลและในชั้นน้ำ พบว่า สารสกัดของ *Allium ascalonicum* ในชั้นเมธานอลขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่สามารถระงับปวดในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส แต่สามารถระงับปวดในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส และสารสกัด *Allium ascalonicum* ในชั้นเมธานอลสามารถระงับปวดได้ดีใน Formalin test ทั้ง early phase (neurogenic phase) และ late phase (inflammatory phase) ในหนูขาว Formalin test เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammatory analgesia) โดยกระตุ้นให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยการฉีดสารเคมี formalin เข้าที่ฝ่าเท้าและสังเกตพฤติกรรมการเลียเท้าของหนูหลังฉีด formalin ในระยะ early phase ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่ออย่างเฉียบพลัน ส่วนใน ระยะ late phase จะมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ ได้แก่ สาร prostaglandin และสารสื่ออื่นๆ เช่น histamine serotonin และ bradykinin การยับยั้งใน early phase อาจมีผลยับยั้งผ่านระบบประสาทรับความรู้สึก หรือผ่าน opioid receptors ในระบบประสาทส่วนกลาง และการยับยั้งในระยะ late phase อาจเกิดจากการยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบ (ปราโมทย์ มหคุณากร, 2553)

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ด้วยสาร *E. coli* LPS จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT Assay พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรไม่แสดงความเป็น

พิษต่อเซลล์ ในการศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ทำโดยตรวจสอบการสังเคราะห์ mRNA ที่เซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สร้างขึ้นด้วยวิธี RT-PCR พบว่ากลุ่มควบคุมเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีการสังเคราะห์ mRNA ของ iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในปริมาณสูง การใช้สารยับยั้งการอักเสบมาตรฐานคือ Aminoguanidine และ Indomethacin ในขนาด 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ได้ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, COX-1, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ระหว่างกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียวพบว่า สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด และสารสกัดกระเทียมยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 และ COX-1 ในขณะที่สารสกัดหอมแดงยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 และไม่มีผลต่อการแสดงออกของ COX-2

จากผลการทดลองที่สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS นั้น ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการรายงานผลของสารสำคัญในกระเทียม ได้แก่ diallyl sulfide, diallyl trisulfide, s-allyl cysteine, และ allicin ที่สามารถลดการผลิตของ nitric oxide โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS (Chang et al., 2005; Liu et al., 2006; Kim et al., 2001; Shin et al., 2013) เอนไซม์ iNOS เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงสาร L-arginine ให้เป็น nitric oxide ปริมาณ nitric oxide ที่เพิ่มขึ้นมากเกินไปภายในเซลล์จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื้อเยื่อถูกทำลายและร่างกายเกิดพยาธิสภาพ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาหาสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS เพื่อรักษาโรคที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ iNOS ที่มากเกินไปได้แก่ ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ ข้ออักเสบ ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง โรค

หืด โรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบและโรคมะเร็ง (Zamora et al., 2000). จากคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ในผลการทดลองนี้ สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลน่าจะเป็นตัวเลือกหนึ่งที่จะพัฒนาเพื่อเป็นยาที่ใช้ในการรักษาภาวะโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบ

Cyclooxygenase หรือ COX เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน arachidonic acid ซึ่งพบที่เซลล์เมมเบรนของเซลล์ทั่วทั้งร่างกาย ไปเป็น Prostaglandins และ Thromboxane (TXA₂) เมื่อเนื้อเยื่อของร่างกายได้รับการบาดเจ็บ จะเกิดการสร้าง Arachidonic acid ขึ้นมาจาก Membrane phospholipids โดยอาศัยเอนไซม์ Phospholipase A₂ แล้ว Arachidonic acid จะถูกเอนไซม์ COX และ lipoxygenase (LOX) เปลี่ยนไปเป็น Prostaglandins และ Leukotrienes (LT) ตามลำดับ ปัจจุบันได้มีการตรวจพบว่าเอนไซม์ Cyclooxygenase ที่สำคัญ 2 isoform ได้แก่ Cyclooxygenase-1 (COX-1) และ Cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยที่เอนไซม์ COX-1 เป็น constitutive form พบในภาวะปกติ มีหน้าที่ดูแล สมดุลของร่างกาย โดยจะเปลี่ยน Arachidonic acid ให้เป็น Thromboxane A₂ (TxA₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂) และ Prostacyclin (PGI₂) ร่วมกันทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเกร็ดเลือด และยับยั้งการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ผิดปกติจนทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด นอกจากนี้ยังทำให้หลอดเลือดขยายตัวขึ้น เพิ่มการหลั่งเยื่อเมือก เพิ่มการหลั่ง bicarbonate บริเวณกระเพาะอาหาร และควบคุมการไหลเวียนของเลือดไปที่ไตรวมทั้งการกรองการขับโซเดียมและน้ำของไต (Schafer, 1999). ในขณะที่เอนไซม์ COX-2 ซึ่งทำหน้าที่เหมือนกัน ส่วนใหญ่จะเป็น inducible form คือจะพบมากขึ้นในภาวะที่ร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือเมื่อมีตัวกระตุ้นที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (de Leval, 2000). เนื่องจาก prostaglandins มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ทำให้เกิดอาการปวดและอาการใช้ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ซึ่งเป็นกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญของยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (Non-steroidal Anti-inflammatory drugs, NSAIDs) จึงเป็นผลให้การสร้าง prostaglandins ลดลงยากกลุ่มนี้ในขนาดต่ำจะสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งลดอาการไข้และอาการปวดทั้งที่เป็นแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง และถ้าใช้ในขนาดสูงจะสามารถลดการอักเสบได้ดี อาจแบ่งยากกลุ่ม NSAIDs ตามฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase ว่ายาจะมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ COX-1 หรือ COX-2 มากกว่ากัน โดยจะใช้ค่า IC₅₀ (Inhibition concentration at 50% คือ ความเข้มข้นของยาที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้าง prostaglandin ได้ ร้อยละ 50) COX-2 : COX-1 (ทำให้สามารถแบ่งยากกลุ่มนี้ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Non-specific cox inhibitors หรือ traditional NSAIDs หรือ classical NSAIDs หมายถึง ยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช้ส

เตียรอยด์ที่มี IC₅₀ COX-2 : COX-1 มากกว่า 1 ได้แก่ aspirin indomethacin ibuprofen, กลุ่มที่ 2 คือ COX-2 selective inhibitors หมายถึง ยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ที่มีค่า IC₅₀ COX-2: COX-1 อยู่ระหว่าง 1-0.01 ได้แก่ meloxicam nimesulide และ etodolac และกลุ่มที่ 3 คือ COX-2 specific inhibitors หมายถึง ยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ที่มีค่า IC₅₀ COX-2: COX-1 น้อยกว่า 0.01 ยากลุ่มนี้ที่ยังไม่ถูกถอนออกจากตลาด ได้แก่ celecoxib parecoxib และ etoricoxib ยาในกลุ่มนี้มีราคาค่อนข้างสูง (พรทวิ เลิศศรีสถิต สุชีลา จันทรวิทยานุชิต) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 จะช่วยลดการเกิดการอักเสบ ฤทธิ์ในการลดการอักเสบและระงับปวดจึงเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ในขณะที่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 อาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่นการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร มีผลเสียต่อการทำงานของไตและการจับกลุ่มกันของเกร็ดเลือด ทำให้มีอุบัติการณ์ของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตเพิ่ม (Lanas, 2009). การแสดงออกของโปรตีน COX-2 ถูกกระตุ้นโดย growth factors สาร Pro-inflammatory cytokines และสารก่อมะเร็ง (carcinogens) ดังนั้นเอนไซม์ COX-2 จึงมีบทบาทสำคัญทั้งในการอักเสบและการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 จึงสามารถพัฒนาเป็นยาด้านอักเสบและยารักษามะเร็งได้ (Dirsch and Vollmar, 2001) มีรายงานการศึกษาว่าสาร diallyl sulfides, ajoene, thiaceomonone ซึ่งเป็นสาร sulfur compounds ที่แยกได้จากกระเทียมสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้ (Sengupta et al., 2004; Elango et al., 2004; Ban et al., 2007; Raman et al., 2008; Lee da et al., 2012) จากการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin และ COX-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin ระหว่างกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS และได้รับสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *E. coli* LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าสารสกัดกระเทียมที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 และ COX-1 จึงอาจสรุปในเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดกระเทียมในเอธานอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 และ COX-1 ได้ ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร prostaglandins และในขนาดที่มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบอาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 และในการทดลองพบว่า สารสกัดหอมแดงยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 โดยแปรตามความแรงของความเข้มข้น และไม่มีผลต่อการแสดงออกของ COX-2 จึงอาจสรุปในเบื้องต้นได้ว่า ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดหอมแดงอาจเกี่ยวข้องกับ

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 น้อย โดยอาจมีกลไกต้านการอักเสบอื่นที่เด่นกว่า เช่นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS หรือเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการหลั่งของสาร Pro-inflammatory cytokines อื่น ๆ

ไซโตไคน์เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีขนาดเล็กสร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายเพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น เช่น การได้รับสาร *E. coli* LPS จะทำให้มีการแสดงออกของยีนของไซโตไคน์ในปริมาณที่สูงขึ้นและทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ไซโตไคน์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับในขั้นตอนแรกของการอักเสบได้แก่ Tumor necrosis factor (TNF)- α , ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างสารไซโตไคน์อื่น ๆ ตามมา เช่น Interleukin(IL)-1 β และ IL-6. ทั้ง TNF- α , IL-1 β และ IL-6 จัดเป็น Pro-inflammatory cytokines และเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเช่นข้ออักเสบเรื้อรังและทำให้มีการทำลายของเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์กระดูก (Zhao et al., 2013) จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α , IL-1 β และ IL-6 โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลนี้มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 และน่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบได้

สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS นั้น ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการรายงานผลของสารสำคัญในกระเทียม ได้แก่ diallyl sulfide, diallyl trisulfide, s-allyl cysteine, และ allicin ที่สามารถลดการหลั่งของ nitric oxide โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร *E. coli* LPS

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล สรุปได้ว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่พบในสารสกัดหอมแดงอยู่ที่ระดับ 15.964 ± 0.122 มิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิก/กรัมของสารสกัด และสารสกัดกระเทียมในเอธานอลมีสารประกอบฟีนอลรวมที่ระดับ 4.020 ± 0.009 มิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิก/กรัมของสารสกัด และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีกับสารอลูมิเนียมคลอไรด์ พบว่าสารสกัดหอมแดงมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเป็น 11.742 ± 0.012 มิลลิกรัมสมมูลกับสารเคอร์ซีทิน/กรัมของสาร

สกัด และสารสกัดกระเทียมในเอธานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเป็น 7.669 ± 0.038 มิลลิกรัมสมมูลกับสารเคอร์ซีทิน/กรัมของสารสกัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลนี้มีส่วนประกอบของสารฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ สอดคล้องกับงานวิจัยของFattorusso และคณะ (2002) การวิเคราะห์ทางพิษเคมีของส่วนหัวของหอมแดงพบสาร Furostanol saponins, ascalonicoside A1/A2 และ ascalonicoside B และในหอมแดงพบสารประกอบ โพลีฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูง ได้แก่ isoliquiritigenin, quercetin และ quercetin glycosides สารประกอบฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์นับเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ และสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมได้ สารฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลอาจเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบอย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาโครงสร้างสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอล

กล่าวโดยสรุป สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลไม่แสดงฤทธิ์ระงับปวดในการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วยวิธี Mouse Hot-Plate และ Mouse Tail-Flick สารสกัดหัวหอมแดงในเอธานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 และมีผลยับยั้งการแสดงออกของ COX-1 โดยไม่ยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 และสารสกัดหัวกระเทียมในเอธานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 และ COX-1 โดยสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบอาจเป็นสารที่เป็นฟีนอลหรือสารฟลาโวนอยด์ ผลการทดลองเหล่านี้สนับสนุนรายงานการวิจัยที่รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของหอมแดงและกระเทียม (Keiss et al., 2003; Lee et al., 2011; Shin et al., 2013; Leelarungrayub et al., 2006; Park et al., 2012) ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในการรักษาโรคที่เกิดจากภาวะการอักเสบอื่นและควรทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยผู้วิจัยขอเสนอแนะดังต่อไปนี้

1. ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สารสกัดหอมแดงในเอธานอลและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลการรักษาภาวะข้ออักเสบรูมาตอยด์หรือโรคที่เกิดจากภาวะการอักเสบอื่น ควรทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบเพื่อเป็นแนวทางในการนำสารดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป
2. หากสามารถหาสารสำคัญในสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมได้ ควรทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ major component ซึ่งเป็นสารที่ทราบแล้ว เช่น ใช้สาร Allicin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในกระเทียมมาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอักเสบ ก็จะทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพิ่มมากขึ้น แต่ทั้งนี้ ควรแยกสารอื่นๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นด้วย
3. แม้ว่าผลการศึกษาเบื้องต้น ในการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงและกระเทียมในเอธานอลให้ผลลบ แต่การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหอมแดงให้ผลบวก ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสกัดหอมแดงอาจมีฤทธิ์ระงับปวดในสภาวะที่มีการอักเสบร่วมด้วย จึงควรทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดหอมแดงด้วย Writhing test และควรพิสูจน์ฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองด้วย Rat-paw edema model
4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นควรเลือกสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กัน เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์และควรเลือกใช้หลายความเข้มข้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและสามารถสรุปและเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมได้
5. สารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลมีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบ แสดงว่าสารสกัดหอมแดงและสารสกัดกระเทียมในเอธานอลน่าจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยสารฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติทั้งในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ แม้ว่าในตัวอย่างสารสกัดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่มาก-น้อยแตกต่างกัน แต่มิได้บ่งบอกถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ จึงจำเป็นต้องทำการพิสูจน์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการทดสอบอื่นๆ อีก

เอกสารอ้างอิง

- จิราภา จอมไธสง. (2549). สารระนำรู้จากผัก หอมแดง ใน จดหมายข่าว ส่วนส่งเสริมการผลิตผัก ไม้ดอกไม้ประดับและสมุนไพร. สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. ปีที่ 3 ฉบับที่ 15.
- บุญเหลือ ศรีมุงคุณและอรอนงค์ วรรณวงษ์. (2552). ปลุกหอมแดงที่ยางขมน้อย ใน น.ส.พ. กสิกร ปีที่ 82 ฉบับที่ 1 มกราคม – กุมภาพันธ์.
- ปราโมทย์ มหคณากร และคณะ. (2553) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด (Study on the anti-inflammatory mechanisms of *Thunbergia laurifolia* leaf extracts). สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- นันทวัน บุญยะประภัศรและอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2543). สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 5. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด.
- พรทวี เลิศศรีสถิต สุชีลา จันทร์วิทยานุชิต. ยาด้านอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs). Available at:
<http://med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/NSAIDS.pdf>
 . Accessed 15/06/2557.
- วันดี กฤษณพันธ์. (2539). เกร็ดความรู้สมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : เมดิคอล มีเดีย.
- สุรพันธุ์ คุณอมรพงศ์. การอักเสบและการซ่อมแซม. Available at:
<http://www.med.cmu.ac.th/dept/patho/Lecture/07-09-inflammation&repair-text.pdf>
 Accessed 30/3/2555.
- สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน เรื่อง กระเทียม. Available at: <http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.asp>
 Accessed 9/9/2009.

อำนาจ ธิธาพันธ์. Posted 04/20/2009. ความปวด Pain : concept & mechanism. ศูนย์การศึกษาต่อเนื่อง คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี. Available at:

<http://ramacme.ra.mahidol.ac.th/?q=node/44>. Accessed 9/9/2009.

Amin M, Kapadnis BP. (2005). Heat stable antimicrobial activity of *Allium ascalonicum* against bacteria and fungi. Indian J Exp Biol. 43: 751-754.

Barrot M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. Neuroscience. 211:39-50.

Banerjee SK, and Maulik S. (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders : a review. Nutri J. 4-18.

Ban JO, et al. (2007). Inhibition of cell growth and induction of apoptosis via inactivation of NF-kappaB by a sulfurcompound isolated from garlic in human colon cancer cells. J Pharmacol Sci. 104: 374-383.

Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. PlantaMed. 70: 93-103.

Chang HP, Huang SY, Chen YH. (2005). Modulation of cytokine secretion by garlic oil derivatives is associated with suppressed nitric oxide production in stimulated macrophages. J Agric FoodChem. 53: 2530-2534.

D'Amour FE. and Smith DL. (1941). A method for determining loss of pain sensation. J Pharmacol Exp Ther. 72: 74-79.

de Leval X, Delarge J, Somers F, de Tullio p, Henrotin Y, Pirotte B, Dogne JM. (2000). Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. Curr Med Chem. 7: 1041-1062.

Dirsch VM, Vollmar AM. (2001). Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? Biochem Pharmacol. 61: 587-593.

- Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. (2006). Anti diabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 13: 624-629.
- Elango EM, Asita H, Nidhi G, Seema P, Banerji A, Kuriakose MA. (2004). Inhibition of cyclooxygenase-2 by diallyl sulfides (DAS) in HEK 293T cells. *J Appl Genet*. 45: 469-471.
- Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, Tagliatalata-Scafati O. (2002). Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.). *J Agric Food Chem* 50, 5686-5690.
- Gorji A. (2003). Pharmacological treatment of headache using traditional persian medicine. *Trends in Pharmacological Sciences*. 24 : 331-334.
- Jalal R, Bagheri SM, Moghimi A, Rasuli MB. (2007). Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *J Clin Biochem Nutr*. 41: 218-223.
- Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R, Vollmar AM. (2003). Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *J Nutr*. 133: 2171-2175.
- Kendler BS. (1987). Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev Med*. 16: 670-685.
- Kim KM, et al. (2001). Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med*. 30: 747-756.
- Kunnumakkara AB, et al. (2009). Traditional uses of spices: an overview. In: Aggarwal BB and Kunnumakkara AB (ed) *Molecular targets and therapeutic uses of spices- modern uses of ancient medicine*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore, pp 1-24.
- Kumar GR and Reddy KP. (1999). Reduced nociceptive response in mice with alloxan induced hyperglycemia after garlic (*Allium sativum* Linn.) treatment. 37 :662-666. [Abst]

- Lanas A, Sopena F (2009). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and lower gastrointestinal complications. *Gastroenterol Clin North Am.* 38 : 333-352.
- Lee EN, et al (2011). Chloroform extract of aged black garlic attenuates TNF- α - induced ROS generation, VCAM-1 expression, NF- κ B activation and adhesiveness for monocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother Res.* 25: 92-100.
- Lee YL, Cesario T, Wang Y, Shanbrom E, Thrupp L. (2003). Antibacterial activity of vegetables and juices. *Nutrition.* 19: 994-996.
- Lee da Y, Li H, Lim HJ, Lee HJ, Jeon R, Ryu JH. (2012). Anti-inflammatory activity of sulfur-containing compounds from garlic. *J Med Food.*15: 992-999.
- Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Chanarat N, Gebicki JM. (2006). Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition.* 22: 266-274.
- Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Srichairatanakool S, Channarat , Gebicki JM. (2004). Anti-oxidative stress and anti-inflammatory effects of Thai shallot (*Allium ascalonicum* L.) extracts in human monocytic (U937) cells. *Niigata J Health Welfare* 4, 11-21.
- Liu KL, Chen HW, Wang RY, Lei YP, Sheen LY, Lii CK. (2006). DATS reduces LPS- induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem.* 54: 3472-3478.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55-63
- Mohammadi-Motlagh HR, Mostafaie A, Mansouri K. (2011). Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonicum*) extract. *Arch Med Sci* 7, 38-44.
- Owoyele BV, Abioye AIR, Afinowi NO, Jimoh SA, Soladoye AO. (2006). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Allium ascalonicum*. *Trop J Health Sci.* 13: 28-32.

- Park HJ, Jeon BT, Kim HC, Roh GS, Shin JH, Sung NJ, Han J, Kang D. (2012). Aged red garlic extract reduces lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and acute pulmonary inflammation through haeme oxygenase-1 induction. *Acta Physiol (Oxf)*. 205: 61-70.
- Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajid N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol*. 5: 1142-1145.
- Raman p, Dewitt DL, Nair MG. (2008) Lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of acidic aqueous extracts of some dietary supplements. *Phytother Res*. 22: 204-212.
- Sarrell EM, Cohen HA, & Kahan E. (2003). Naturopathic treatment for ear pain in children. *Pediatrics*. 111: 574-579. [Abst]
- Singleton VL, Joseph A and Rossi Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult*. 16:144-158.
- Schafer AL. (1999). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory therapy on platelets. *Am J Med*. 106: 255-365.
- Sengupta A, Ghosh S, Das S. (2004). Modulatory influence of garlic and tomato on cyclooxygenase-2 activity, cell proliferation and apoptosis during azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat. *Cancer Lett*. 208: 127-136.
- Seyfi p, Mostafaie A, Mansouri K, Arshadi D, Mohammadi-Motlagh HR, Kiani A. (2010). In vitro and in vivo anti-angiogenesis effect of shallot (*Allium ascalonicum*): a heat-stable and flavonoid-rich fraction of shallot extract potently inhibits angiogenesis. *Toxicol In Vitro*. 24: 1655-1661.

- Shin JH, Ryu JH, Kang MJ, Hwang CR, Han J, Kang D. (2013). Short-term heating reduces the anti-inflammatory effects of fresh raw garlic extracts on the LPS-induced production of NO and pro-inflammatory cytokines by downregulating allicin activity in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 58: 545-551
- Shobana S, Naidu KA. (2000). Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 62: 107-110.
- Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. (2003). Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. *J Med Microbiol.* 52: 29-34
- Thomson M, Ali M. (2003). Garlic [*Allium sativum*] , a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Curr Cancer Drug Targets.* 3: 67-81.
- Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, Uehara N, Yoshizawa K. (2011). Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anticancer Agents Med Chem.* 11: 249-253.
- Wiczowski W, et al. (2008). Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr.* 138: 885-888.
- Wang HX, Ng TB. (2002). Ascalin, a new anti-fungal peptide with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase-inhibiting activity from shallot bulbs. *Peptides* .23: 1025-1029.
- Won JH, Im HT, Kim YH, Yun KJ, Park HJ, Choi JW, Lee KT. (2006). Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. *Br J Pharmacol.* 148: 216-225
- Wongmekiat O, et al. (2008). Beneficial effect of shallot (*Allium ascalonicum* L.) extract on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 46(5): 1844-1850.
- Woolfe G, MacDonald AD. (1944). The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther.* 80: 300-7.

- Yin MC, Tsao SM. (1999). Inhibitory effect of seven Allium plants upon three Aspergillus species. *Int J Food Microbiol.* 49: 49-56.
- Zamora R, Vodovotz Y, and Billiar TR. (2000). Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med.* 6: 347-373.
- Zhao R, Zhou H, Su SB. (2013). A critical role for interleukin-1beta in the progression of autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.*17: 658-669.