

ฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ซีซีเอ 233 ในสัตว์ทดลอง

นางสาวปฐวีณกร เกษโกมล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF STANDARDIZED
EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa 233 IN ANIMAL MODELS

Miss Pataweekorn Ketkomol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัด มาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในสัตว์ทดลอง
โดย	นางสาวปฐวีณกร เกษโกมล
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืออากาศโทหญิง เกสัชกรหญิง ดร.ภัศราภา ไตวิวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ เกสัชกร ดร.บุญยงค์ ตันตีสิริระ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.มยุรี ตันตีสิริระ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมสมบุญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรวิ ลิ้มปนลิตธิกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืออากาศโทหญิง เกสัชกรหญิง ดร.ภัศราภา ไตวิวัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกร ดร.บุญยงค์ ตันตีสิริระ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.มยุรี ตันตีสิริระ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จันทน์ อธิพานิชพงศ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงลักษณ์ สุขวานิชย์ศิลป์)

ปฐวีณกร เกษโกมล : ฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดมาตรฐาน
บัวบก อีซีเอ 233 ในสัตว์ทดลอง . (ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-
INFLAMMATORY ACTIVITIES OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA*
ASIATICA ECa 233 IN ANIMAL MODELS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.
ร.ท. หญิง ดร. ภัสราภา ไตวิวัฒน์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ภก. ดร.บุญยงค์
ตันติสิริระ, รศ. ภญ. ดร.มยุรี ตันติสิริระ, 101 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด
มาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ให้โดยการบ้วนปากแก่หนูเมาส์ ก่อนที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วยวิธี hot-plate วิธี
tail-flick วิธี acetic acid-induced writhing และทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่อุ้ง
เท้าด้วยคาราจีแนน เปรียบเทียบผลของอีซีเอ 233 ในขนาดต่างๆ (10-300 มก./กก.) กับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับคาร์บอกซีเมทิล
เซลลูโลส (0.5%) และยามาตรฐาน พบว่า อีซีเอ 233 สามารถออกฤทธิ์ระงับปวดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ
เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จะมีฤทธิ์อ่อนกว่ายา ระงับปวดมาตรฐานในทุกวิธีทดสอบ โดยพบว่า อีซีเอ 233 จะออกฤทธิ์
ระงับปวดได้ในขนาด 60-300 มก./กก.เมื่อทดสอบด้วยวิธี hot-plate และฤทธิ์ดังกล่าวของ อีซีเอ 233 ในขนาด 300 มก./
กก.จะถูกยับยั้งได้ด้วย นาลอกโซน ในขณะที่เมื่อทดสอบ ด้วยวิธี tail-flick พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 100-300 มก./กก. จะ
แสดงฤทธิ์ระงับปวดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าการออกฤทธิ์ระงับปวดของ อีซีเอ
233 น่าจะเป็นผลสืบเนื่องจากการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางทั้งในระดับเหนือไขสันหลังและไขสันหลัง และอาจ
เป็นการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับ ตัวรับ opioids นอกจากนั้นจากการที่พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 60-300 มก./กก. สามารถ
ออกฤทธิ์ระงับการบิดงอตัวที่เกิดจากการฉีดกรดอะซิติคเข้าช่องท้องได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบด้วยวิธี writhing และ
ฤทธิ์ดังกล่าวของ อีซีเอ 233 ในขนาด 300 มก./กก.จะถูกยับยั้งได้ด้วย นาลอกโซนเช่นกัน แสดงว่านอกเหนือจากการออก
ฤทธิ์ระงับปวดโดยการออกฤทธิ์ผ่านระบบประสาทส่วนกลางแล้ว อีซีเอ 233 ยังสามารถออกฤทธิ์ระงับปวดในระดับของ
ระบบประสาทส่วนปลายโดยผ่านตัวรับ opioids ได้อีกด้วย สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำ
ให้อุ้งเท้าบวมด้วยการฉีดคาราจีแนน พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 100-300 มก./กก. สามารถลดการบวมของอุ้งเท้าหนูได้
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน ชั่วโมงที่ 4-5 หลังจากฉีดคาราจีแนน ซึ่งถือเป็น ระยะที่ 2 ของการบวม ซึ่งเชื่อว่าเป็นการบวมที่
เกี่ยวข้องกับพรอสตาแกลนดิน สอดคล้องกับการที่พบว่าอีซีเอ 233 ในขนาด 300 มก./กก.สามารถลดการบวมของอุ้งเท้าหนู
ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการฉีดพรอสตาแกลนดิน อี 2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงว่า อีซีเอ 233 มีฤทธิ์ระงับปวด โดยมีการออกฤทธิ์ได้ทั้งในระดับประสาท
ส่วนกลางและระดับประสาทส่วนปลาย โดยอาจมีกลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งซึ่งเกี่ยวข้องกับตัวรับ opioid และอีกส่วนหนึ่งที่
เกี่ยวกับฤทธิ์ลดการอักเสบในส่วนที่พรอสตาแกลนดินมีบทบาทสำคัญ ควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อให้เข้าใจฤทธิ์ระงับปวดของ
อีซีเอ 233 ได้อย่างชัดเจน

สาขาวิชา: เกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา: 2554..... ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5387316420 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa 233 / ANTINOCICEPTION / ANTI-INFLAMMATORY / HOT-PLATE TEST / TAIL-FLICK TEST / ACETIC ACID-INDUCED WRITHING / CARRAGEENAN-INDUCED PAW EDEMA / PGE₂-INDUCED PAW EDEMA

PATAWEEKORN KETKOMOL : ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa 233 IN ANIMAL MODELS. ADVISOR: ASST. PROF. FLG. OFF. PASARAPA TOWIWAT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D., ASSOC. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D., 101 pp.

The present study aimed to investigate analgesic and anti-inflammatory effects of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 as well as its underlying mechanisms. Various doses of ECa 233 (10-300 mg/kg) were orally given to the animals before they were subjected to hot plate test, tail flick test and acetic acid-induced writhing test to evaluate analgesic activity in mice and carrageenan-induced paw edema in rats. The effects of ECa 233 were compared to those of 0.5% carboxymethylcellulose or respective standard drugs. Significant analgesic activity of ECa 233 was demonstrated in all animal models tested, however, the analgesic effect observed was comparatively weaker than its respective standard drug. Analgesic activity of ECa 60-300 mg/kg in the hot plate test was observed at the doses 300 mg/kg and it was significantly inhibited by naloxone. Analgesic activity of ECa 233 (100-300 mg/kg) was demonstrated in tail flick test. Results observed in these two models suggested that ECa 233 might exert its opioid mediated- analgesic activity by centrally acting mechanism, both at supraspinal or spinal levels. In addition, ECa 233 at the doses of 60-300 mg/kg was found to significantly reduced acetic acid (i.p.) induced writhing in rats and the effect observed at the doses 300 mg/kg was abolished by naloxone. Analgesic activity involving opioid receptors at the peripheral level was thus indicated. Further testing in carrageenan-induced paw edema in rats demonstrated anti-inflammatory effect of ECa 233 at the doses of 100-300 mg/kg. Significant effect was observed at phase 2 of inflammation, at 4-5 hours after the injection of carrageenan, suggesting the involvement of prostaglandins. Accordingly, prostaglandin E₂-induced paw edema was significantly reduced by ECa 233 at the dose of 300 mg/kg.

Based on the results obtained, it can be concluded that ECa 233 possess analgesic activity which seemed to involve both central and peripheral nervous mechanisms. Opioid mediated mechanism and possibly, analgesic activity secondary to anti-inflammatory activity demonstrated by ECa 233 could, in part, accounted for the results observed. Prostaglandins seemed to play role in anti-inflammatory activity of ECa 233. Further investigation should be carried out to get more insight into the analgesic activity of ECa 233.

Field of Study : Pharmacology Student's Signature
Academic Year : 2011 Advisor's Signature
Co-advisor's Signature
Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ. ร.ท.หญิง ดร.ภัศราภา ไตวิวัฒน์ อาจารย์ที่
 ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ภก. ดร. บุญยงค์ ตันตีสิริระ และ รศ. ภญ. ดร.มยุรี ตันตีสิริระอาจารย์ที่
 ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือเกื้อกูลในทุกๆ เรื่อง
 ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ เพื่อให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.วัชรวิ ลิมปนลธิติกุล ผู้อำนวยการ หลักสูตรวิทยาศาสตร์
 มหาลัยเทคโนโลยี สาขาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา) ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. พ.ต.ท.(หญิง) สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ หัวหน้า
 ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาอำนวยความสะดวกใน
 เรื่องการใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ. จันทนี อิทธิพานิชพงศ์ และ รศ. ดร.เนงลักษณ์ สุขวานิชย์ศิลป์ ที่
 กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ. ภก. ดร. เอกรินทร์ สายฟ้า ภาควิชาเภสัชพิษศาสตร์ คณะเภสัช
 ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดมาตรฐาน อีซีเอ 233

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ คำสั่งสอน ตลอดการศึกษาในระดับ
 มหาลัยบัณฑิต

ขอขอบคุณบุคลากรภาควิชาเภสัชวิทยาและสัตววิทยาทุกท่าน รุ่นพี่นิสิตปริญญาเอก
 เพื่อนนิสิตทุกคน และขอบคุณนางสาว อนุสรณ์ จงชนะพงศ์ และ นางสาวชญาณิน กิรติไพบูลย์ ที่
 อำนวยความสะดวก ให้ความอนุเคราะห์ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำที่ดีเกี่ยวกับ
 เทคนิคต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ของข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุน
 ในด้านการศึกษาและให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้มีส่วนทำให้
 วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
สมมติฐานงานวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
แผนงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ความเจ็บปวด.....	5
การอักเสบ.....	14
บวมก.....	16
สารสกัดมาตรฐานบวมก อีซีไอ 233	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
สัตว์ทดลอง.....	23
เครื่องมืออุปกรณ์.....	23
สารเคมี.....	24
วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
วิธีการทดลอง.....	25
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	33

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	34
4.1. ผลการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีไอ 233	
เปรียบเทียบกัวยาระงับปวดมาตรฐาน.....	34
4.1.1 Mouse Hot-plate test.....	34
4.1.2 การทดสอบผลของ naloxone ต่อฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐาน	
บัวบก อีซีไอ 233 ด้วยวิธี Hot-plate test.....	39
4.1.3 Mouse Tail-flick test.....	42
4.1.4 Acetic acid-induced writhing test.....	47
4.1.5 การทดสอบผลของ naloxone ต่อฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐาน	
บัวบก อีซีไอ 233 ด้วยวิธี acetic acid-induced writhing test.....	50
4.2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีไอ 233	
เปรียบเทียบกัวยาระงับปวดมาตรฐาน.....	51
4.2.1 Carrageenan-induced paw edema test.....	51
4.2.2 Prostaglandin E ₂ -induced paw edema test.....	55
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง.....	59
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	74
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ผลที่เกิดจากการกระตุ้น opioid receptors ทั้ง 3 subtype.....	12
4.1	ผลของ indomethacin ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan ในหนูแรท แสดงเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ 0.9% normal saline solution.....	52
4.2	ผลของ อีซีเอ 233 ขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan ในหนูแรท แสดงเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับ 0.5% CMC.....	53
4.3	ผลของ indomethacin ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 µg/ml prostaglandin E ₂ ในหนูแรท แสดงเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ 0.9% normal saline solution	56
4.4	ผลของ อีซีเอ 233 ขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 µg/ml prostaglandin E ₂ ในหนูแรท แสดงเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ 0.5% CMC.....	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กระบวนการรับรู้ความเจ็บปวด (pain pathways).....	6
2.2	ความแตกต่างของเส้นประสาทนำความเจ็บปวด.....	7
2.3	ความแตกต่างในอัตราการนำสัญญาณประสาทของเส้นประสาทชนิด A-delta fibers และ C fibers.....	8
2.4	สารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดความเจ็บปวด.....	10
2.5	ตำแหน่งการออกฤทธิ์ของ opioids.....	13
2.6	ขั้นตอนการสังเคราะห์ prostaglandins.....	15
2.7	บัวบก (<i>Centella asiatica</i> Linn.) Urban.....	17
2.8	โครงสร้างของสารสำคัญที่พบในบัวบก.....	17
2.9	สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233.....	21
3.1	Hot-plate analgesiometer.....	26
3.2	Tail-flick analgesiometer.....	28
3.3	การเกิด writhing response.....	29
3.4	Plethysmometer.....	31
4.1	การตอบสนองของหนูเม้าส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับเวลา (นาที)) ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution และ morphine.....	35
4.2	พื้นที่ได้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเม้าส์ ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution และ morphine ขนาด 10 มก./กก.	36
4.3	การตอบสนองของหนูเม้าส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับ เวลา (นาที)) ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.5%CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก.	37
4.4	พื้นที่ได้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเม้าส์ ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก.....	38
4.5	การตอบสนองของหนูเม้าส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับ เวลา (นาที)) ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ naloxone ขนาด 5 มก./กก., 0.5% CMC, อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. หรือ naloxone ร่วมกับ อีซีเอ 233.....	40

ภาพที่	หน้า
4.6	พื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเมาส์ ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ naloxone ขนาด 5 มก./กก., 0.5% CMC, อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. หรือ naloxone ร่วมกับ อีซีเอ 233 41
4.7	การตอบสนองของหนูเมาส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับ เวลา (นาที)) ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution และ morphine..... 43
4.8	พื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเมาส์ ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution และ morphine ขนาด 10 มก./กก. 44
4.9	การตอบสนองของหนูเมาส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับ เวลา (นาที)) ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.5%CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก. 45
4.10	พื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเมาส์ ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก. 46
4.11	จำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ของหนูเมาส์ ใน acetic acid-induced writhing test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution และ indomethacin... 48
4.12	จำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ของหนูเมาส์ ใน acetic acid-induced writhing test หลังจากได้รับ 0.5% CMC, อีซีเอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก. 49
4.13	จำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ของหนูเมาส์ ใน acetic acid-induced writhing test หลังจากได้รับ 0.5% CMC, อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก.หรือ naloxone ร่วมกับ อีซีเอ 233..... 50
4.14	กราฟแสดงปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าหนูแรทกับเวลา (1-6 ชั่วโมง) หลังจากได้รับ สารทดสอบชนิดต่างๆ ใน carrageenan-induced paw edema test 54
4.15	กราฟแสดงปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าหนูแรทกับเวลา (0-240 นาที) หลังจาก ได้รับสารทดสอบชนิดต่างๆ ใน prostaglandin E ₂ -induced paw edema test..... 58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

α	alpha
β	beta
δ	delta
γ	gamma
κ	kappa
μ	mu
%MPE	percentage of maximum possible effect
ก.	กรัม
กก.	กิโลกรัม
ซม.	เซ็นติเมตร
นก.	นาโนกรัม
พ.ศ.	พุทธศักราช
มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
CMC	carboxymethylcellulose
COX	cyclooxygenase
IFN- γ	interferon-gamma
IL	interleukin
IND	indomethacin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
kg	kilogram
LPS	lipopolysaccharide
MDA	malondialdehyde
μ g	microgram
μ l	microlitre
mg	milligram
ml	millilitre

MO	morphine sulphate
MPO	myeloperoxidase
NAL	naloxone
NO	nitric oxide
NSAIDs	nonsteroidal antiinflammatory drugs
NSS	normal saline solution
No	number
PTZ	pentylenetetrazole
PGE ₂	prostaglandin E ₂
ECa 233	standardized extract of <i>Centella asiatica</i> ECa 233
S.E.M.	standard error of the means
TNF	tumor necrosis factor

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความเจ็บปวด (pain) หมายถึง ความรู้สึกไม่สบายทางกายหรือจิตใจซึ่งอาจจะมีแนวโน้มที่เกิดจากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ โดยทำหน้าที่เป็นสัญญาณเตือนภัยที่มีความไวสูง เพื่อบอกให้ทราบว่ามีภาวะผิดปกติหรืออันตรายเกิดขึ้น ความเจ็บปวดเป็นปัญหาสุขภาพที่พบบ่อยในประชากรทั่วไป ผลการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าประชากรสูงวัย ประมาณ 7-59% (Crombie และคณะ, 1994; Croft และคณะ, 1993) มีโรคที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บปวด ซึ่งปัญหาหลักที่พบคือ ความเจ็บปวดแบบเรื้อรัง (chronic pain) และเมื่อเกิดขึ้นแล้วมักก่อให้เกิดผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยไม่มากนักน้อย และเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยต้องหาทางรักษาหรือบรรเทาอาการเจ็บปวด ซึ่งความเจ็บปวดอาจเกิดขึ้นเดี่ยวๆ หรือเกิดร่วมกับการอักเสบ (inflammation)

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ จัดเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมหรือสิ่งที่จะทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ ภาวะที่มีการอักเสบมากเกินไปอาจทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกาย ทำให้เกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ความเจ็บป่วยหรือทำให้เกิดโรคกลุ่มแพ้ภูมิตนเอง (autoimmune diseases) เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคข้อเสื่อมอักเสบ (osteoarthritis) และ ซิสเทมิกลูปัสอีริทีมาโตซัส (systemic lupus erythematosus; SLE) เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการอักเสบยังมีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงที่พบในโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง (cancer) ภาวะไขมันสะสมในผนังหลอดเลือด (atherosclerosis) โรคหลอดเลือดหัวใจ (ischemic heart disease) และกลุ่มโรคที่มีการเสื่อมของเนื้อเยื่อ (degenerative diseases) เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นต้น

ยาที่มีฤทธิ์ระงับปวดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ ยาในกลุ่ม opioids เช่น morphine, fentanyl และ codeine เป็นต้น ใช้สำหรับระงับอาการปวดระดับปานกลางถึงรุนแรง ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางโดยการกระตุ้น ที่ opioid receptors เช่นเดียวกับ endorphin และ enkephalin ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่สร้างจากระบบประสาทและระบบต่อมไร้ท่อในร่างกาย ยาในกลุ่ม opioids มีผลข้างเคียงต่อระบบการหายใจ ความดันโลหิต และยังทำให้หัวใจเต้นช้าลง และการได้รับยาในกลุ่มนี้ติดต่อกันไปนานๆ อาจมีผลทำให้เกิดการติดยา หรือต้องเพิ่มขนาดยาขึ้นเรื่อยๆ เพื่อให้ได้ผลตอบสนองต่อยาดังเดิม หรือทำให้ติดยาได้ (Raj และคณะ, 1996)

ในขณะที่ยาในกลุ่ม NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammation drugs) เช่น ibuprofen, indomethacin, piroxicam เป็นยาบรรเทาปวดซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบด้วยการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ทำให้การสร้าง prostaglandins (Wolfe และคณะ, 1976) ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาการอักเสบลดลง การใช้ยาในกลุ่มนี้เป็นเวลานานทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย เช่น เป็นพิษต่อตับและไต รบกวนการทำงานของเกล็ดเลือด ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารหรือลำไส้ ซึ่งเป็นอาการข้างเคียงที่รุนแรงจนอาจทำให้เกิดภาวะโลหิตจางจากการสูญเสียเลือดจากแผลในทางเดินอาหารได้ (Willer และคณะ, 1989; Mahnberg และคณะ, 1992) การใช้ยาในกลุ่ม NSAIDs ที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ผู้ป่วยที่จำเป็นต้องใช้ยาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานมีอัตราความเสี่ยงสูงที่จะเกิดฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ โดยเฉพาะในผู้ป่วยสูงอายุ ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามที่จะค้นคว้าพัฒนายาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการบรรเทาปวดหรือต้านการอักเสบเพิ่มขึ้น และมีผลข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาอย่างต่อเนื่องที่น้อยกว่ายาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

การค้นคว้าพัฒนายาจากสมุนไพรหรือสารสกัดจากสมุนไพรสำหรับใช้บรรเทาปวดและต้านการอักเสบเป็นแนวคิดที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก สมุนไพรที่มีการใช้มาตั้งแต่สมัยโบราณและในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับฤทธิ์บรรเทาปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบคือ บัวบก (*Centella asiatica* Urban) อยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นพืชสมุนไพรที่ขึ้นในพื้นที่เขตร้อนชื้น โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย ที่สามารถพบได้หลายประเทศ เช่น พม่า อินเดีย ชีเย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ศรีลังกา ไทย เป็นต้น บัวบกอาจเรียกตามแหล่งที่พบ เช่น มาเลเซีย เรียกว่า Pegaga , จีนเรียกว่า Luei Gong Gen หรือ Tung Chain และ อินโดนีเซีย เรียกว่า Daun Kaki Kuda เป็นต้น สารสำคัญที่พบได้ในสารสกัดบัวบกนั้น เป็นสารในกลุ่ม triterpenes คือ asiatic acid, asiaticoside, madecassoside และ madecassic acid (ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์, 2538) บัวบกเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้ในการแพทย์ด้านอายุรเวช พบว่ามีการใช้บัวบกรักษาภาวะการอักเสบ (inflammation), โรคโลหิตจาง (anemia), โรคหืด (asthma), หลอดลมอักเสบ (bronchitis), ไข้ (fever) มีการศึกษาพบว่าสารสกัดบัวบกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), เสริมฤทธิ์การเรียนรู้จดจำและต้านโรคซึมเศร้าได้ด้วย (Gupta และคณะ, 2003)

ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 พบว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบกยังมีความเป็นพิษต่ำ โดยสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่นำมาทดลองนั้นมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวนวล มีปริมาณ triterpenoid glycosides ไม่น้อยกว่า 85% มีอัตราส่วนของ madecassoside (53%) ต่อ asiaticoside (32%) อยู่ในช่วง $1.5 \pm 0.5:1$

(Tantisira, 2008) งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบ รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดและผลการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของ สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 โดยเปรียบเทียบกับยาระงับปวดและยาต้านการอักเสบมาตรฐานด้วยโมเดลมาตรฐานที่ใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์ระงับปวดและ ฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นการสร้างความรู้ใหม่ด้านเภสัชวิทยาของ สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ซึ่งอาจพัฒนาเป็นยาสำหรับระงับปวดและต้านการอักเสบ

สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบ

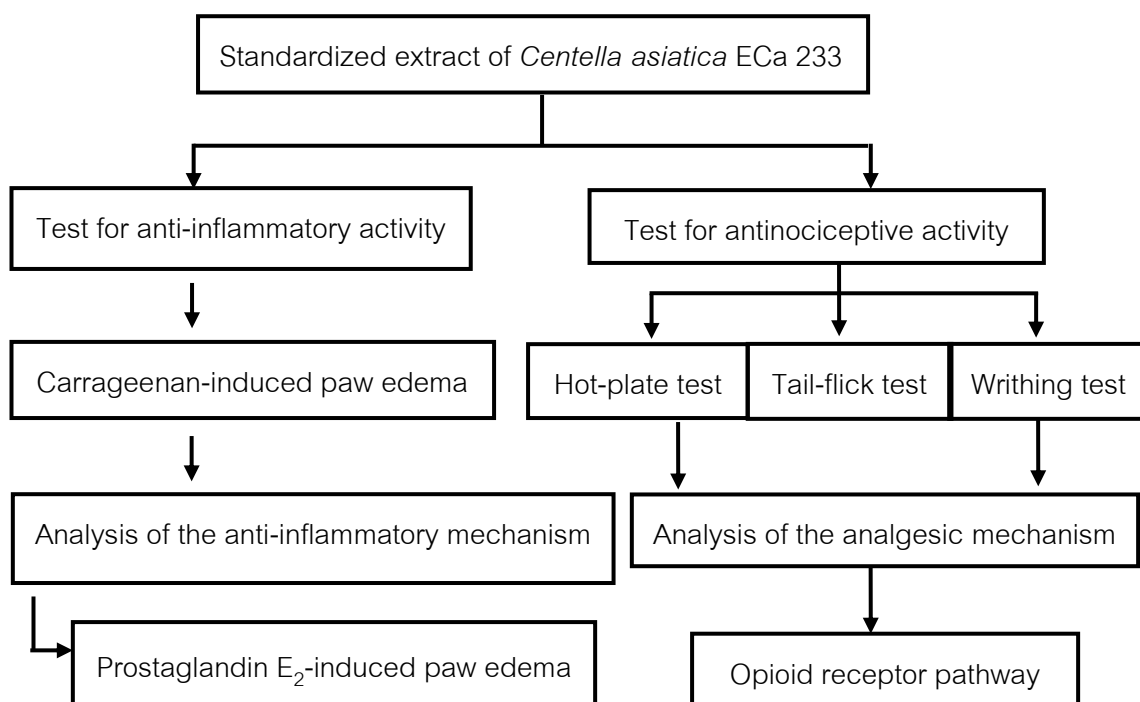
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ระงับปวดและต้านการอักเสบของ สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 เปรียบเทียบกับยาระงับปวดและยาต้านการอักเสบมาตรฐาน
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดของ สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ผ่านทาง opioid receptor
3. เพื่อศึกษาผลการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของ สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ผ่านทาง prostaglandin

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทราบถึงผลในการระงับปวดและต้านการอักเสบของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ให้ทางปาก จะเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ด้านเภสัชวิทยาและเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยาสำหรับระงับปวดและต้านการอักเสบ

แผนงานวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเจ็บปวด (Pain)

ในปี ค.ศ. 1979 The International Association for the Study of Pain (IASP) ให้คำนิยามของความเจ็บปวด (pain) ว่า “unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage” ซึ่งหมายถึง ประสบการณ์ความรู้สึกทางร่างกายและทางอารมณ์ที่ไม่เป็นสุข เป็นอาการที่สลับซับซ้อน ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ หรือการที่เนื้อเยื่อถูกทำลาย (Berry และคณะ, 2006) นอกจากนี้ความเจ็บปวดยังมีส่วนช่วยเตือนให้ร่างกายรู้ว่ากำลังได้รับอันตราย ทำให้ร่างกายเกิดปฏิกิริยาหลบหนีต่อสิ่งเร้าที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บ (Cervero, 1941) โดยทั่วไปสามารถแบ่งความเจ็บปวดออกเป็น 2 ประเภท คือความเจ็บปวดแบบเฉียบพลัน และความเจ็บปวดแบบเรื้อรัง

1. ความเจ็บปวดชนิดเฉียบพลัน (acute pain) เกิดจากการได้รับสิ่งกระตุ้นที่รุนแรง จนทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย เช่น การผ่าตัด อุบัติเหตุ การคลอดบุตร หรือมีแผลที่ผิวหนัง เป็นต้น เราสามารถบอกสาเหตุ และตำแหน่งที่รู้สึกเจ็บปวดได้ โดยระยะเวลาของความเจ็บปวดจะเกิดในระยะสั้นๆ (Bonica, 1979)

2. ความเจ็บปวดชนิดเรื้อรัง (chronic pain) เป็นความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นติดต่อกัน นานเป็นเดือนหรือเป็นปี อาจเกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทเนื่องจากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อในระยะเฉียบพลัน เช่น โรคกระดูก การผ่าตัดกระดูกสันหลัง เป็นต้น สาเหตุเหล่านี้สร้างความทุกข์ทรมานจนอาจเกิดผลกระทบทางจิตใจและร่างกาย โดยปกติจะลงความเห็นว่าความเจ็บปวดนั้นเป็นความเจ็บปวดเรื้อรังเมื่อเกิดขึ้นนานเกินกว่า 3 เดือน (Benjamin, 1996)

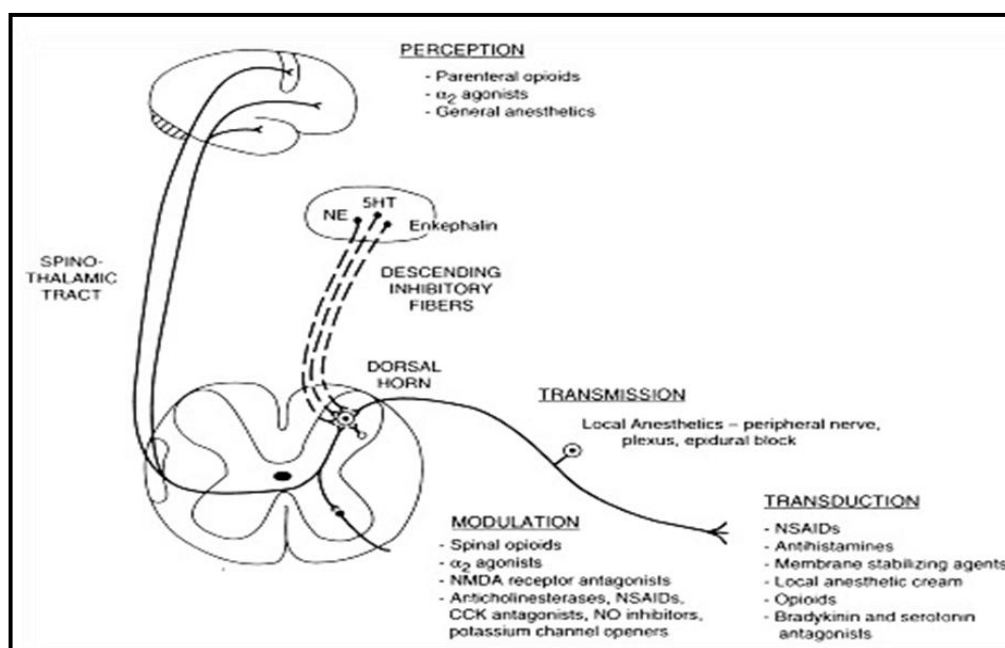
2.1.1 กระบวนการรับรู้ความเจ็บปวด (pain pathways) แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังรูปที่ 2.1

1. การแปลงสัญญาณ (transduction) เริ่มจากตัวรับความเจ็บปวด (nociceptors) ที่อยู่บริเวณปลายสุดของเส้นปลายประสาท (free nerve ending) (Melzack, 1965) เมื่อ nociceptors ถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนแปลงพลังงานที่ได้จากรูปหนึ่งไปสู่อีกรูปหนึ่ง เช่น แปลงพลังงานกล พลังงานเคมี พลังงานความร้อน ไปเป็นพลังงานไฟฟ้า แล้วส่งสัญญาณไปตามเส้นประสาทในรูปแบบ ศักย์ไฟฟ้า (action potential) เข้าสู่ไขสันหลัง (Iggo, 1976)

2. การส่งผ่านสัญญาณ (transmission) เป็นกระบวนการส่งผ่านสัญญาณประสาทจากตำแหน่งที่เกิด transduction ผ่านไปตาม periperal nerve fibers ผ่าน dorsal root ganglion เข้าสู่บริเวณ substantia gelatinosa ของ dorsal horn และปลายสุดของเส้นประสาทดังกล่าวจะ synapse กับเซลล์ประสาทจำนวนมากใน dorsal spinal gray matter เพื่อทำหน้าที่รับสัญญาณประสาทส่งต่อไปยัง thalamus จนถึงสมองในส่วน cortex เรียกวิถีประสาทนี้ว่า spinothalamic pathway หรือที่เรียกว่า ascending pathway ซึ่งทำให้ร่างกายรับรู้ความเจ็บปวด (Nauta และ Kuypers, 1958)

3. การปรับสัญญาณ (modulation) เป็นการทำงานของระบบประสาทในการนำส่งสัญญาณประสาทจากสมองไปยังความเจ็บปวด เรียกวิถีประสาทนี้ว่า descending pathway (Hughes, 1975) วิถีประสาทนี้เกิดจากการ นำส่งสัญญาณจากสมองมา กระตุ้น periaqueductal gray matter (PAG) ทำให้ส่งกระแสประสาทไปกระตุ้นเซลล์ประสาทในบริเวณ nucleus raphe magnus (NRM) ให้หลั่ง serotonin, endorphin และ enkephalin ส่วน locus ceruleus (LS) จะส่งสัญญาณมายับยั้งการนำกระแสประสาทในระดับ spinal cord โดยอาศัย noradrenaline ทำให้การส่งสัญญาณประสาทช้าขึ้นลดลง ความเจ็บปวดก็น้อยลง (Keele และ Armstrong, 1964)

4. การรับรู้ (perception) เป็นการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง เพื่อรับรู้สัญญาณความเจ็บปวดที่เข้ามาสมองส่วน somatosensory cortex (Iggo, 1976)



รูปที่ 2.1 กระบวนการรับรู้ความเจ็บปวด (pain pathways) ทั้ง 4 ขั้นตอน



(Kelly และคณะ, 2001)

2.1.2 ตัวรับความเจ็บปวด (nociceptors)

nociceptors เป็น primary afferents ซึ่งอยู่บริเวณปลายสุดของเส้นปลายประสาท (free nerve ending) พบอยู่มากที่บริเวณผิวหนัง ผนังหลอดเลือด เนื้อเยื่อที่อยู่ลึกลงไป และอวัยวะภายใน (Iggo, 1972) nociceptors จะตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหลายชนิด เช่น แรงแกล สารเคมี หรืออุณหภูมิ นอกจากนี้ยังอาจถูกกระตุ้นได้ด้วยสารเคมี เช่น prostaglandins, histamine, bradykinin และ serotonin (Keele และ Armstrong, 1964) เมื่อ nociceptors ถูกกระตุ้นจะส่งสัญญาณความเจ็บปวดในรูปของ noxious impulses ผ่านไปตามเส้นประสาท (nerve fibers) เข้าสู่ไขสันหลัง สามารถแบ่ง nociceptive nerve fibers ออกเป็น 2 ชนิด คือ myelinated A-delta fibers และ unmyelinated C fibers ดังรูปที่ 2.2

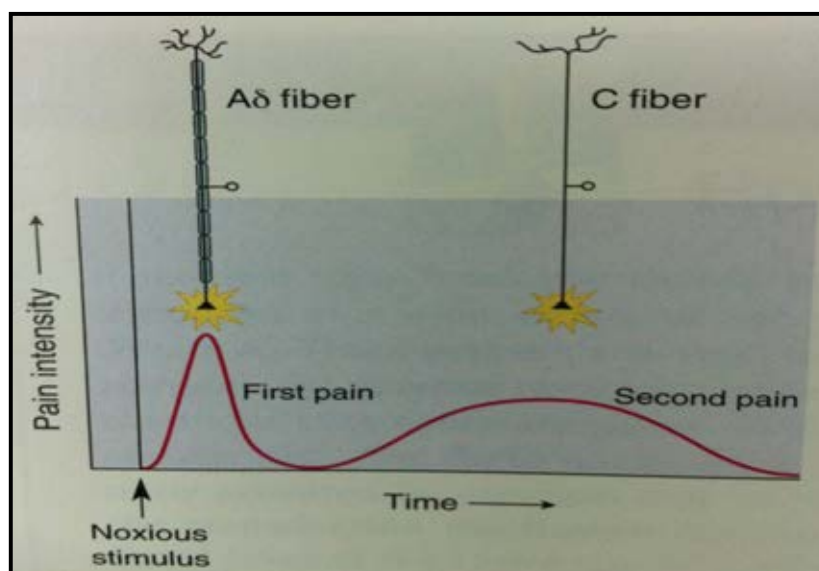
1. myelinated A-delta fibers เป็นเส้นประสาทที่มีขนาด กลางและมีเยื่อ myelin หุ้ม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-5 μm สามารถนำสัญญาณประสาทด้วยความเร็ว ประมาณ 12-30 เมตรต่อวินาที ทำให้เกิดความเจ็บปวดแบบแปลบ จี๊ดๆ สามารถบอกตำแหน่งที่เจ็บปวดได้ ส่วนมากจะเกิดทันทีที่ได้รับบาดเจ็บทางผิวหนัง เช่น มีดบาด ผ่าตัด หรือประสบอุบัติเหตุ (Iggo, 1972)

2. unmyelinated C fibers เป็นเส้นประสาทที่มีขนาดเล็ก และไม่มีเยื่อ myelin หุ้ม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 μm สามารถนำสัญญาณประสาทด้วยความเร็ว ประมาณ 0.2-2 เมตรต่อวินาที ทำให้เกิดความเจ็บปวดแบบตื้อๆ ไม่สามารถบอกตำแหน่งที่เจ็บปวดได้ รวมทั้งความเจ็บปวดที่มาจากอวัยวะภายใน หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกลงไป (Besson และคณะ, 1987)

	Aδ Fibre	
	Lightly myelinated	
	Medium diameter	~ 53 °C Type I
	Nociception (mechanical, thermal, chemical)	~ 43 °C Type II
	C fibre	
	Unmyelinated	
	Small diameter	
	Innocuous temperature, itch	~ 43 °C
	Nociception (mechanical, thermal, chemical)	

รูปที่ 2.2 ความแตกต่างของเส้นประสาทนำความเจ็บปวด

ความแตกต่างในอัตราการนำสัญญาณประสาทของเส้นประสาทชนิด A-delta และ C fibers ทำให้เกิดการรับรู้ในระดับสมองได้ไม่เท่ากัน การรับรู้ในระยะแรกจึงถูกเรียกว่า first หรือ fast pain และในระยะที่สองถูกเรียกว่า second หรือ slow pain ส่วนปลายอีกด้านของ nociceptors ทุกชนิดจะไปสิ้นสุดที่ dorsal horn ของ spinal cord ซึ่ง dorsal horn จะเป็นศูนย์ควบคุมของข้อมูลที่ได้รับเข้ามาจากเซลล์ประสาทขาเข้า (Barry และคณะ, 2007) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ความแตกต่างในอัตราการนำสัญญาณประสาทของเส้นประสาทชนิด A-delta fibers และ C fibers

2.1.3 กลไกที่ก่อให้เกิดสัญญาณนำเข้าความเจ็บปวด สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. nociceptive pain หมายถึง ความเจ็บปวดที่เกิดจากการที่ตัวรับความเจ็บปวด (nociceptors) ทำให้เกิดการส่งสัญญาณไปตามเส้นประสาทจาก spinal cord เข้าสู่สมองส่วน cortex ทำให้ร่างกายรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวด และหากมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อก็อาจจะมีการหลั่งสารพวก chemical mediators เช่น substance P, prostaglandins, histamine, bradykinin และสารอื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้จะยิ่งไปกระตุ้น nociceptors มากยิ่งขึ้น ทำให้มีการนำส่งสัญญาณความรู้สึกเจ็บปวดมากขึ้นได้ (Lundberg, 1964) สำหรับวิถีประสาทขาลง หรือเรียกว่า descending pathway เกิดจากการนำส่งสัญญาณจากสมองไปยังยังความรู้สึกเจ็บปวด ซึ่งก็จะทำให้มีการหลั่ง inhibitory neurotransmitters เช่น serotonin และ norepinephrine ซึ่งสาร

เหล่านี้ก็จะไปยับยั้ง substance P และสารอื่นๆ ทำให้การส่งสัญญาณประสาทขาขึ้นลดลง ความเจ็บปวดก็จะน้อยลงได้ เมื่อมีการกระตุ้นเกิดขึ้นซ้ำๆ (เช่น ในภาวะที่มีการอักเสบเกิดขึ้น) ตัวรับความเจ็บปวดจะมีความไวต่อสิ่งเร้าเพิ่มขึ้น ทำให้ขีดกั้นความเจ็บปวด (pain threshold) ลดต่ำลง และก่อให้เกิดภาวะ allodynia หมายถึง ความรู้สึกเจ็บปวดที่เกิดจากการกระตุ้นโดยสิ่งเร้าซึ่งโดยปกติไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด หรือภาวะ hyperalgesia หมายถึง ระดับความเจ็บปวดที่มากกว่าปกติเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด หรือภาวะที่มีความเจ็บปวดเกิดขึ้นโดยไม่มีสิ่งเร้า (Barry และคณะ, 2007)

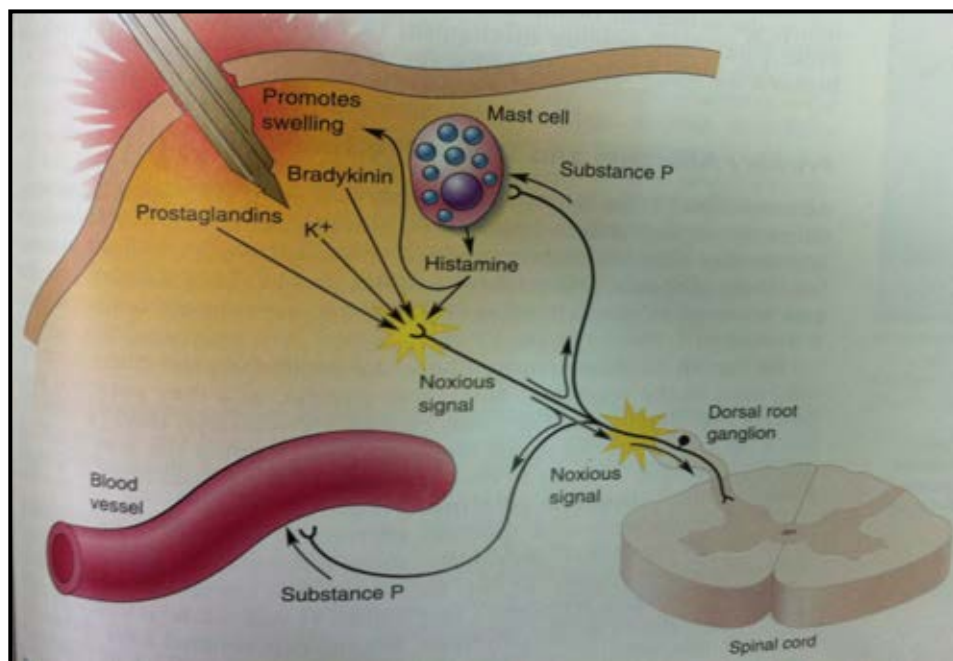
2. peripheral neurogenic pain หมายถึง ความเจ็บปวดที่เกิดจากระบบประสาทส่วนปลายถูกทำลายโดยตรง การบาดเจ็บเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น มีแรงมากระทำ การติดเชื้อโรคทางระบบหลอดเลือด เมแทบอลิซึม หรือฮอร์โมน และผลข้างเคียงของยาบางชนิด เป็นต้น ลักษณะสำคัญของความเจ็บปวดที่เกิดจากระบบประสาทส่วนปลาย เช่น เจ็บแปลบคล้ายเข็มทิ่ม (tingling) ปวดแสบปวดร้อน (burning) หรือคล้ายไฟฟ้าช็อต เป็นต้น (Gilman และคณะ, 1985) ในกรณีที่เนื้อเยื่อประสาทส่วนปลายถูกตัดขาด ส่วนที่งอกขึ้นมาใหม่จะมีความไวต่อการกระตุ้นจากสิ่งเร้ามากกว่าปกติ (เกิดภาวะ allodynia หรือ hyperalgesia) และสามารถสร้างกระแสประสาทขึ้นมาเองโดยไม่มีสิ่งเร้า (ทำให้เกิดอาการเจ็บปวดตลอดเวลาได้) การเปลี่ยนแปลงของระบบประสาทส่วนปลายลักษณะข้างต้นอาจเกิดขึ้น ในกรณีที่เส้นประสาทถูกกดทับอย่างเรื้อรังด้วย (Stanton-Hick และคณะ, 1995)

2.1.4 สารเคมีที่ทำให้เกิดความเจ็บปวด

สารที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดความเจ็บปวด เช่น histamine, bradykinin, serotonin, prostaglandins และ substance P โดยทั่วไปสารสื่อประสาท (neurotransmitters) เหล่านี้จะถูกสร้างและเก็บไว้ในถุงเก็บที่ปลายประสาท (axon terminal) เพื่อป้องกันเอนไซม์ในไซโตพลาสซึมทำลาย และจะถูกปล่อยออกมาจากถุงเก็บ (vesicles) โดยอาศัยแคลเซียมไอออนจากภายนอกเซลล์ เมื่อมีสัญญาณประสาทมาถึงปลายประสาท แคลเซียมไอออนจะแพร่เข้าไปในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์สูงขึ้น จากนั้นแคลเซียมไอออนจะรวมกับโปรตีนที่เยื่อผนังเซลล์ด้านในและเหนี่ยวนำให้ถุงเก็บสารสื่อประสาทเคลื่อนมาติดผนังเซลล์ จากนั้นถุงเก็บจะหลอมรวมกับเยื่อผนังเซลล์แล้วปล่อยสารสื่อประสาทออกมาสู่ synaptic cleft เมื่อสารสื่อประสาทเคลื่อนผ่าน synaptic cleft จะไปจับกับตัวรับบนเยื่อผนังเซลล์ของ post-synaptic terminal จากนั้นจะไปกระตุ้นเยื่อผนังเซลล์เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของโซเดียมไอออน

เกิดภาวะ depolarization หรือไปยับยั้งเยื่อผนังเซลล์ยอม ให้โปแตสเซียมไอออน ไหลออกและให้คลอไรด์ไอออนเข้าเซลล์เกิดภาวะ hyperpolarization (Barry และคณะ, 2007)

โดยเฉพาะ substance P จะพบอยู่บริเวณปลายประสาทรับความรู้สึกที่ทำให้เจ็บปวด และจะหลั่งออกมาเมื่อได้รับสัญญาณกระตุ้นเป็นความเจ็บปวด ซึ่ง substance P มีฤทธิ์แรงมากในการทำให้หลอดเลือดขยายตัวและทำให้เกิดการบวมได้ นอกจากฤทธิ์โดยตรงแล้วยังมีผลทำให้ histamine ถูกปลดปล่อยออกมาจาก mast cells ซึ่งตัว histamine จะทำหน้าที่กระตุ้น nociceptors และยังทำให้หลอดเลือดขยายตัวและมีการบวมอีกด้วย การที่สาร substance P ถูกปลดปล่อยออกมาจากปลายประสาทรับความรู้สึกเจ็บปวดนั้นเพื่อทำหน้าที่เป็น Axon reflex และถูกยับยั้งด้วยเอนโดรฟินที่มาจากระบบประสาทส่วนกลาง (Barry และคณะ, 2007) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 สารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดความเจ็บปวด

ปัจจุบันมีวิธีการระงับความเจ็บปวดให้เลือกใช้หลากหลายวิธี ทั้งนี้จะต้องพิจารณาจากสาเหตุของความเจ็บปวด รวมทั้งผลข้างเคียงจากการรักษาที่อาจเกิดขึ้นได้ และวิธีที่นิยม คือ การใช้ยาระงับความปวด (analgesics)

2.1.5 ยาที่มีฤทธิ์ระงับความเจ็บปวด (analgesics) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. ยาระงับปวดชนิดไม่เสพติด (non-narcotic analgesics) เป็นยากลุ่มที่นิยมใช้ในการลดไข้ ลดการอักเสบ และระงับความเจ็บปวดระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง ตัวอย่างเช่น aspirin, acetaminophen และ nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ยาในกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน แต่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่คล้ายกันโดยไปยับยั้งการสร้าง prostaglandins (PG) ซึ่งเป็นสารสื่อการอักเสบ (chemical mediators) ที่สำคัญชนิดหนึ่งในการก่อให้เกิดความเจ็บปวด การบวม อาการไข้ ซึ่งการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) เป็นผลให้การสร้าง prostaglandins ทุกชนิดน้อยลง (Vane และคณะ, 1971) ข้อดีของยากลุ่มนี้คือไม่ก่อให้เกิดภาวะดื้อยา (tolerance) ภาวะที่ร่างกายชินกับยา (physical dependence) และการติดยา (addiction) แต่หากใช้เกินความจำเป็นอาจเกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆ เช่น เกิดแผลและเลือดออกในกระเพาะอาหารหรือลำไส้ กระทบการทำงานของเกล็ดเลือด เป็นอันตรายต่อดับและไต เกิดการแพ้ และผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Willer และคณะ, 1989; Mahnberg และคณะ, 1992)

2. ยาระงับปวดชนิดเสพติด (narcotic analgesics) เช่น morphine, fentanyl, codeine ยาระงับความเจ็บปวดทั้งหมดนี้เรียกว่า opioids เป็นยาระงับความเจ็บปวดที่มีฤทธิ์แรงและประสิทธิภาพสูง ใช้ในการระงับความเจ็บปวดระดับปานกลางถึงรุนแรง มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการจับตัวรับในสมองและไขสันหลัง และในเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ในระบบทางเดินอาหาร เรียกตัวรับนี้ว่า opioid receptor ซึ่งแบ่งออกเป็น subtype ต่างๆ 3 ชนิด ได้แก่ μ (mu), κ (kappa) และ δ (delta) (Zola และ Mcleod, 1983) เมื่อถูกกระตุ้นโดย opioid จะออกฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์อื่นๆ ที่แตกต่างกัน (Martin, 1967) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ผลที่เกิดจากการกระตุ้น opioid receptors ทั้ง 3 subtype

receptor	activities of postulated opioid receptor
μ_1 (mu-1)	ระงับความเจ็บปวดระดับเหนือไขสันหลัง (supraspinal), ภาวะเคลิ้มสุข (euphoria) และม่านตาหรี (miosis)
μ_2 (mu-2)	ภาวะง่วงซึม (Sedation), กดการหายใจ (respiratory depression), เสพติดทางกาย (physical dependence) และท้องผูก (constipation)
κ_1 (kappa-1)	ระงับความเจ็บปวดระดับไขสันหลัง (spinal), ม่านตาหรี (miosis), ภาวะเป็นทุกข์ (dysphoria) และภาวะง่วงซึม (sedation)
κ_3 (kappa-3)	ระงับความเจ็บปวดระดับเหนือไขสันหลัง (supraspinal)
δ_1 (delta-1)	ระงับความเจ็บปวดระดับไขสันหลัง (spinal) , ภาวะเป็นทุกข์ (dysphoria) และประสาทหลอน (hallucinations)
δ_2 (delta-2)	ระงับความเจ็บปวดระดับเหนือไขสันหลัง (supraspinal)

2.1.5.1 ฤทธิ์ระงับความเจ็บปวดของ opioids

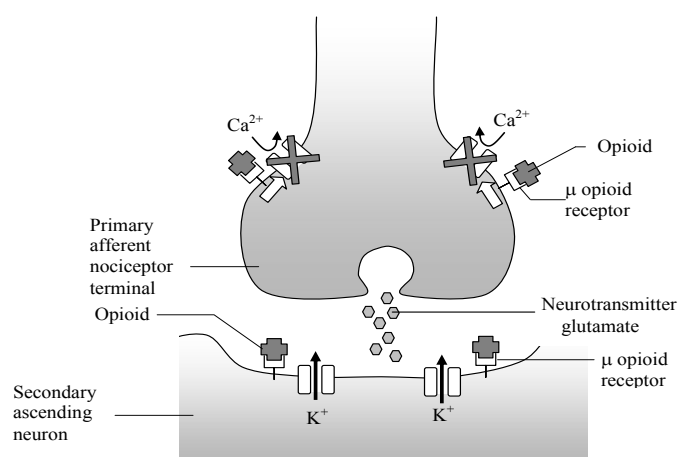
ยากลุ่ม opioids ออกฤทธิ์ผ่าน opioid receptor โดยเฉพาะอย่างยิ่ง μ -receptor ซึ่งมีฤทธิ์ระงับความเจ็บปวดต่อระบบประสาทส่วนกลางทั้งระดับเหนือไขสันหลังและไขสันหลัง และต่อระบบประสาทส่วนปลาย (Hughes และคณะ, 1975) ดังนี้

ฤทธิ์ระงับความเจ็บปวดระดับเหนือไขสันหลัง (supraspinal analgesia) opioids สามารถจับกับ opioid receptor ที่บริเวณ periaqueductal gray matter (PAG) และ nucleus reticularis paragigantocellularis (NRPG) ทำให้ส่งสัญญาณประสาทไปกระตุ้นเซลล์ประสาทในบริเวณ nucleus raphe magnus (NRM) ให้สร้าง serotonin, endorphin, enkephalin ส่วน locus ceruleus (LS) จะส่งสัญญาณมายับยั้งการนำกระแสประสาทในระดับ spinal cord โดยอาศัย noradrenaline จากนั้นสารเหล่านี้จะไปจับกับ opioid receptor ในระดับ dorsal horn บริเวณ substantia gelatinosa (lamina II) ส่งผลไปยับยั้งการส่งสัญญาณความเจ็บปวด ทำให้ความเจ็บปวดลดลง (Wu และคณะ, 1983)

ฤทธิ์ระงับความเจ็บปวดระดับไขสันหลัง (spinal analgesia) เมื่อมีสัญญาณความเจ็บปวดส่งผ่าน peripheral nerve fiber มาถึงบริเวณ pre-synaptic terminal ซึ่งมี opioid receptor ทั้ง 3 ชนิดอยู่ เมื่อ opioids จับกับ opioid receptor จะส่งสัญญาณทาง G-proteins ให้

เกิดการยับยั้งเอนไซม์ adenyl cyclase ทำให้ระดับ cAMP ภายในเซลล์ต่ำลง มีผลทำให้ voltage-gated Ca^{2+} channel เปิดน้อยลง ทำให้แคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง และส่งผลทำให้ K^+ channel เปิด ทำให้โปแตสเซียมไอออนไหลออกจากเซลล์ จึงเกิดการส่งผ่านสัญญาณประสาทได้ยาก เนื่องจากต้องใช้เวลาแคลเซียมไอออน ในการปลดปล่อย substance P ซึ่งเป็นตัวนำความรู้สึกเจ็บปวดไปสู่ post-synaptic neuron ลดลงด้วย เรียกกระบวนการนี้ว่า pre-synaptic inhibition (Duggan และคณะ, 1983) ส่วนที่ post-synaptic neuron จะมี μ -receptor เมื่อมี opioid มากกระตุ้นจะทำให้มีการปลดปล่อยโปแตสเซียมไอออน ออกจากเซลล์มากขึ้น ทำให้เกิด inhibitory post-synaptic potential (IPSP) เกิด hyperpolarization ทำให้สัญญาณประสาทที่จะถูกกระตุ้นต่อไปเกิด action potential ยากขึ้น ทำให้ความเจ็บปวดลดลงได้ เรียกกระบวนการนี้ว่า post-synaptic inhibition (Duggan และคณะ, 1983) ดังรูปที่ 2.5

ฤทธิ์ระงับความเจ็บปวดต่อระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral analgesia) opioids ยับยั้งการถูกกระตุ้นของ nociceptor (pain receptor) ที่บริเวณปลายประสาท ทำให้การส่งสัญญาณประสาทผ่าน peripheral nerve fiber เกิดยากขึ้น ทำให้ความเจ็บปวดลดลง



รูปที่ 2.5 ตำแหน่งการออกฤทธิ์ของ opioids

2.1.5.2 อาการไม่พึงประสงค์

เมื่อได้รับยาในขนาดที่ใช้ในการรักษามีผลทำให้คลื่นไส้ อาเจียน ปากแห้ง คอแห้ง ท้องผูก ความดันโลหิตต่ำ อาจทำให้เกิดการแพ้ได้ แต่ถ้าได้รับยาในขนาดใช้ที่สูง จะกดการหายใจ ม่านตาหรี่ และโคม่า ฉะนั้นต้องแก้ไขทันทีโดยใช้ยา naloxone ซึ่งเป็น opioid antagonist ซึ่งออกฤทธิ์ต้านที่ μ -receptor ที่ใช้รักษาอาการที่เกิดจากการได้รับ opioids เกินขนาด (Weinstein และคณะ, 1973)

2.2 การอักเสบ (inflammation)

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค การตายของเซลล์จากการขาดเลือดหรือขาดออกซิเจน เป็นต้น กระบวนการอักเสบจัดเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมหรือสิ่งที่จะทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ ผลของการอักเสบจะทำให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคออกไป หากไม่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น ร่างกายจะไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้ เนื้อเยื่อจะเกิดการบาดเจ็บโดยที่ไม่มีการซ่อมแซม ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อผิดปกติไป โดยทั่วไปการอักเสบแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

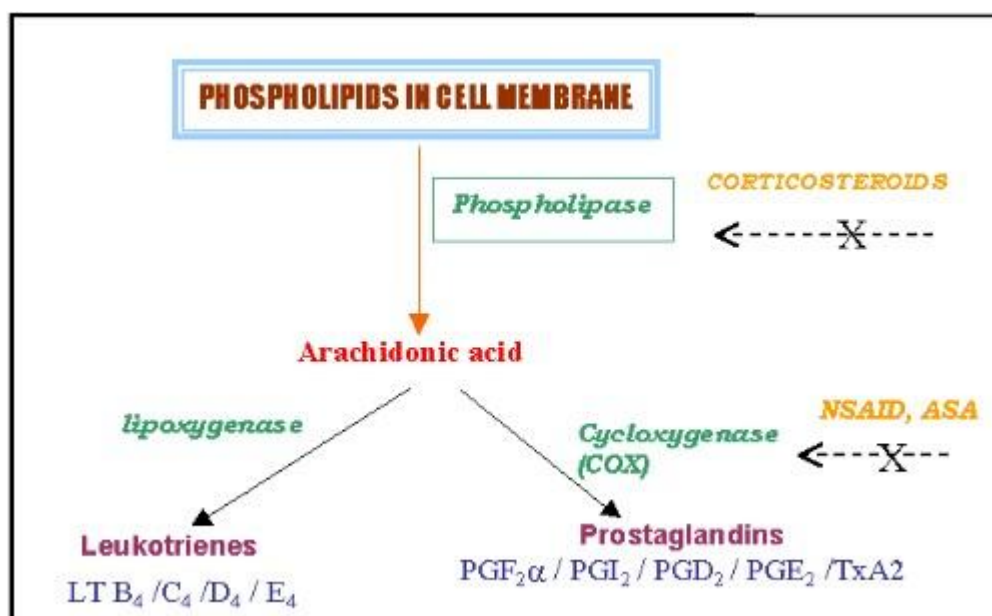
1. การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) จะเกิดขึ้นรวดเร็ว ภายในระยะเวลาเป็นวินาทีหรือเป็นนาที่หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและคงอยู่ประมาณ 2 ถึง 3 วัน แต่มักไม่เกิน 1 สัปดาห์ ลักษณะสำคัญของการอักเสบเฉียบพลัน คือ การบวมของเนื้อเยื่อ (edema) มีสารน้ำซึ่งมีโปรตีน (exudate) ภายในเนื้อเยื่อ และพบเซลล์อักเสบชนิด neutrophils (Ma และคณะ, 2003)

2. การอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) จะเกิดนานกว่าการอักเสบเฉียบพลัน ซึ่งอาจเกิดตามหลังการอักเสบแบบเฉียบพลัน ลักษณะสำคัญของการอักเสบเรื้อรัง คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น (fibrosis) มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบชนิด macrophages และ lymphocytes (Ma และคณะ, 2003)

ลักษณะทางคลินิกของการอักเสบ โดยเฉพาะการอักเสบเฉียบพลันจะประกอบด้วยอาการหลัก 5 อาการ คือ ปวด (pain), บวม (swelling), แดง (redness), ร้อน (heat) และการสูญเสียการทำงาน (loss of function) ที่บริเวณนั้น (Vane, 1976) ในกระบวนการอักเสบจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ที่ซับซ้อน ต้องอาศัยเซลล์และเนื้อเยื่อหลายชนิด รวมทั้งสารเคมีซึ่งทำหน้าที่เป็นสื่อ (chemical mediator) ในการชักนำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น หลังจาก chemical mediators ถูกสร้างแล้วหลังออกมาจะมีอายุค่อนข้างสั้น เนื่องจากจะถูกกลไกอื่นๆ ของร่างกายทำลายอย่างรวดเร็ว เพราะหากปล่อยให้สารเหล่านี้ออกฤทธิ์มากเกินไปจนความจำเป็น มักจะมีผลเสียต่อเนื้อเยื่อ ตัวอย่าง chemical mediators ได้แก่ histamine, serotonin, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO) และ prostaglandins (PG) เป็นต้น โดยเฉพาะ prostaglandins เป็นสารสื่อการอักเสบ ที่สำคัญชนิดหนึ่งในการก่อให้เกิดความเจ็บปวด การบวม อากาศไข และการอักเสบ (Moncada และ Vane, 1978)

การสังเคราะห์ prostaglandins เริ่มต้นจากเอนไซม์ phospholipase A_2 สลาย phospholipid จากผนังเซลล์ให้เกิดการปล่อย arachidonic acid แล้วนำไปสร้าง prostaglandins (Dorp, 1973) นอกจากนี้ยังมีสารหลายชนิดซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A_2 ให้เกิดการสร้าง arachidonic acid เช่น epinephrine, bradykinin, histamine (Baenziger และคณะ, 1980) นอกจากนี้ยังพบว่า การขาดเลือด (ischemia) และการได้รับบาดเจ็บ มีส่วนไปกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง prostaglandins ออกมาจากเซลล์ (Hornstra และคณะ, 1978)

การเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid โดยเอนไซม์ cyclooxygenases (COX) จะทำให้ได้ prostaglandins (PG) หลายชนิด ได้แก่ PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (prostacyclin) และ TXA_2 (thromboxane) (Vane, 1976) ซึ่งสารที่มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดอาการเจ็บปวด อากาไร และอาการอักเสบ คือ PGE_2 นอกจากนี้ยังพบว่า PGE_2 มีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Bergstrom และคณะ, 1964) ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการสังเคราะห์ prostaglandins

ยาที่ใช้รักษาอาการอักเสบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. ยากลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) ตัวอย่างเช่น indomethacin, mefenamic acid, ibuprofen ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin ผ่านทางเอนไซม์ cyclooxygenase (Wolfe และคณะ, 1976) จึงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดอาการไข้ และระงับความเจ็บปวด แต่หากใช้ยาเกินความจำเป็นทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่น เกิดแผลและเลือดออกในกระเพาะอาหารหรือลำไส้ รบกวนการทำงานของเกล็ดเลือด เป็นอันตรายต่อดับและไต เกิดการแพ้ ผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ ง่วงซึม ปวดศีรษะ มึนงง ซึมเศร้า เป็นต้น (Willer และคณะ, 1989; Mahnberg และคณะ, 1992)

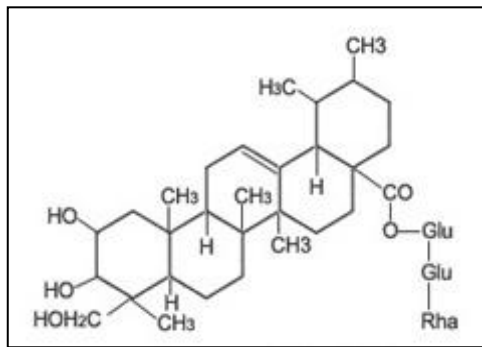
2. ยาต้านการอักเสบประเภทสเตียรอยด์ ตัวอย่างเช่น prednisolone, dexamethasone ยากลุ่มนี้ช่วยบรรเทาอาการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง เพราะไปรบกวนเอนไซม์ phospholipase A₂ ในขั้นตอน arachidonic acid metabolism (Raz และคณะ, 1977) การใช้สเตียรอยด์ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน จะส่งผลเสียต่อร่างกายหลายประการ ได้แก่ ทำให้ร่างกายติดเชื้อง่ายขึ้น เกิดโรค Cushing's syndrome หากให้สเตียรอยด์ในขนาดสูง ๆ มีผลกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราได้ง่าย และสเตียรอยด์จะกดอาการของการติดเชื้อไว้ ทำให้ตรวจพบเมื่ออาการรุนแรงแล้ว (Robinson และคณะ, 1974)

2.3 บัวบก (*Centella asiatica*)

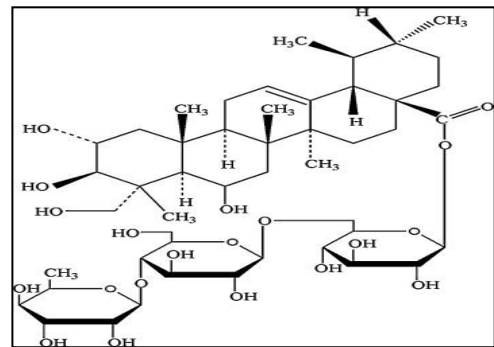
บัวบกมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Centella asiatica* (Linn.) Urban. จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นพืชสมุนไพรที่ขึ้นในพื้นที่เขตร้อนชื้น โดยจะมีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก เลื้อยแผ่ไปตามพื้นดินมีรากงอกตามข้อของลำต้น โผล่ที่แผ่ไปจะงอกไปจากข้อสูงขึ้น 3-5 ใบ ขอบที่ขึ้นแฉะ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวคล้ายรูปไต เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 ซม. ปลายใบกลม ขอบใบหยัก ก้านใบยาว ใบมีกลิ่นหอม จะออกดอกเป็นช่อสีม่วง ออกที่ซอกใบ ขนาดเล็ก 2-3 ดอก ผลมีสีเขียวหรือขาวขนาดเล็ก เป็นผลแห้ง แตกได้ (ดั่งรูปที่ 2.7) สารสำคัญที่พบได้ในสารสกัดบัวบกนั้น เป็นสารในกลุ่ม triterpenes คือ asiatic acid, asiaticoside, madecassoside และ madecassic acid (ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์, 2538) (ดั่งรูปที่ 2.8) บัวบกเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้ในการแพทย์ด้านอายุรเวท ส่วนที่ใช้เป็นยานั้น จะใช้ทั้งต้นสด ใบ และเมล็ด โดยบัวบกถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการต่างๆ เช่น เจ็บคอ ร้อนใน กระหายน้ำ ลดไข้ ขับปัสสาวะ แก้ท้องเสีย (Somchit และคณะ, 2004) โดยเฉพาะการนำมาใช้สมานแผลและเร่งการสร้างเนื้อเยื่อรวมถึงการใช้เป็นยากระตุ้นระบบความจำและระบบประสาท (Hussin และคณะ, 2007; Husain และคณะ, 2008)



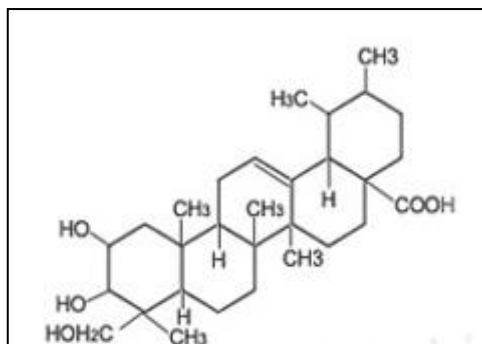
รูปที่ 2.7 บัวบก (*Centella asiatica* Linn.) Urban



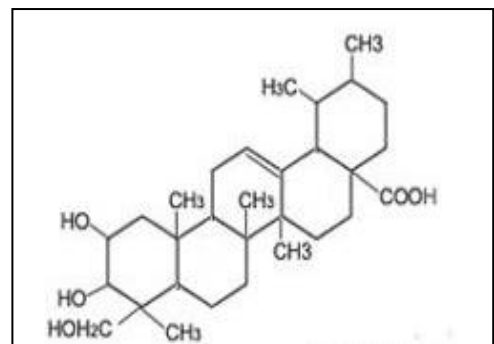
Asiaticoside



Madecassoside



Asiatic acid



Madecassic acid

รูปที่ 2.8 โครงสร้างของสารสำคัญที่พบในบัวบก

2.3.1 ข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

การศึกษาของ Somchit และคณะ (2004) ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยน้ำจากบัวบก ด้วยวิธี prostaglandin E₂-induced paw edema ในหนูแรท พบว่า สารสกัดบัวบก ในขนาด 4 และ 10 มก./กก. สามารถลดการบวมจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย prostaglandin E₂

การศึกษาของ อรัญญา และคณะ (2552) ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยน้ำจากบัวบก ด้วยวิธี carrageenan-induced paw edema test พบว่า สารสกัดบัวบก ในขนาด 0.8, 2 และ 3.2 ก./กก. สามารถลดการบวมชั่วโมงที่ 3 ได้ 65.23±6.51%, 74.33±13.52% และ 93.25±5.04% ตามลำดับ

การศึกษาของ Yun และคณะ (2008) พบว่า asiatic acid และ asiaticoside ที่สกัดด้วยเมทานอลจากจากบัวบก ในขนาด 30 , 60 และ 120 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์ RAW 264.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยยับยั้งทำให้ปริมาณของ nitric oxide synthase (iNOS), COX-2, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ลดลง และทำให้การผลิต nitric oxide (NO) และ prostaglandin E₂ (PGE₂) ลดลง

2. ฤทธิ์ระงับความปวด (Antinociception Activity)

การศึกษาของ Sakina และ Dandiya (1990) พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากบัวบก ขนาด 20 มก./กก. มีฤทธิ์ระงับปวดในหนูแรทได้

การศึกษาของ Somchit และคณะ (2004) ทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดด้วยน้ำจากบัวบก ด้วยวิธี acetic acid-induced writhing พบว่า สารสกัดบัวบก ในขนาด 10, 30, 100 และ 300 มก./กก. สามารถลดการเกิด writhing จากการเหนี่ยวนำให้เกิดความปวดด้วย 0.6% acetic acid (10 มล./กก.) และนอกจากนี้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ *Centella asiatica*-induced antinociception โดยการให้ naloxone ซึ่งเป็น opioid antagonist ร่วมกับ สารสกัดบัวบก (300 มก./กก.) พบว่า เปอร์เซ็นต์การลดการเกิด writhing จาก 85.4% ลดลงเป็น 54.2% แสดงว่า สารสกัดบัวบก ออกฤทธิ์ผ่าน opioid receptor คล้ายกับ morphine ส่วนการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วยวิธี hot plate test พบว่า สารสกัดบัวบก สามารถยับยั้งพฤติกรรมก้าวร้าวก้าวร้าว หรือกระโดดอย่างรุนแรง ซึ่งถือว่าเป็น end point ที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้ เป็นแบบสัมพันธ์กับขนาดของยา

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

การศึกษาของ Ahmad และคณะ (1998) พบว่า สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากบัวบกนั้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้

การศึกษาของ Ray (1976) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากบัวบก พบว่าสารสกัดบัวบก สามารถต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *Escherichia coli*

การศึกษาของ Oyedeki และ Afolayan (2005) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากบัวบก โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากบัวบกมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) และแกรมลบ (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*)

4. ฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบ

การศึกษาของ Mokka-smit และคณะ (1971) พบว่า สารสกัดด้วย 50% เอทานอลจากบัวบก สามารถฆ่าพยาธิในลำไส้เล็กใน guinea pigs ที่ขนาด 10 มก./มล. และสารสกัดด้วย 95% เอทานอลจากบัวบก ทำให้กล้ามเนื้อเรียบส่วน duodenum ของกระต่ายคลายตัวและมดลูกของหนูที่ไม่ตั้งครรภ์คลายตัวได้ (Ramaswamy และคณะ, 1970)

5. ฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (Antiulcer activity)

การศึกษาของ Cheng และ Koo (2000) เมื่อป้อนสารสกัดด้วย 95% เอทานอลจากบัวบก ในขนาด 0.05, 0.25 และ 0.5 ก./กก. และสารสกัดด้วย 50 % เอทานอล ในขนาด 10 มล./กก. ทางปากแก่หนูแรท หลังจากการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร พบว่า สารสกัดบัวบกมีฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร โดยลดขนาดของแผลและลดการทำงานของเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO)

6. ฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Neurological effects)

การศึกษาของ Gupta และ Kumar (2003) เมื่อป้อนสารสกัดด้วยน้ำจากบัวบก ในขนาด 200 มก./กก. ทางปากแก่หนูแรท เป็นเวลา 14 วัน พบว่า มีผลช่วยให้กระบวนการเรียนรู้และความจำดีขึ้น และพบว่าสารสกัดบัวบกช่วยลดระดับของ malondialdehyde (MDA) ในสมองของหนูแรทอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าหนูแรทได้รับสารสกัดบัวบกขนาด 300 มก./กก. ทางปาก พบว่าอาการชักลดลง จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการชักด้วย pentylenetetrazole (PTZ)

7. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Cytotoxic activity)

การศึกษาของ Babu และคณะ (1995) ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และสัตว์ทดลอง (*in vivo*) พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากบวบกั้งกิ่งบริสุทธิ์และแบบหยาบนั้น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

8. การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity assessment)

การทดสอบความเป็นพิษ เมื่อฉีดสารสกัดด้วย 50% เอทานอลจากบวบกั้ง เข้าทางช่องท้องของหนูเมาส์ ในขนาด 250 ก./กก. และเมื่อฉีดสารสกัดบวบกั้งด้วย 70% เอทานอลเข้าใต้ผิวหนังหรือให้ทางปากแก่หนู แรท ในขนาด 10 ก./กก. ไม่พบความเป็นพิษ (Dhar และคณะ, 1968; Mokkahsmit และคณะ, 1971)

9. ฤทธิ์สมานแผล (Wound healing effects)

การศึกษาของ Shukla และคณะ (1999) พบว่า สาร asiaticoside ในขนาด 1 ก./กก. จากสารสกัดด้วย 95% เอทานอลจากบวบกั้งนั้นมีฤทธิ์สมานแผล เมื่อให้สาร asiaticoside ทางปากแก่หนูตะเภาปกติและหนูแรทที่เป็นเบาหวานพบว่าช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเนื้อเยื่อ (tensile strength) และเพิ่มปริมาณคอลลาเจนที่ผิวหนังบริเวณแผล

การศึกษาของ Maquart และคณะ (1999) พบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอลจากบวบกั้ง (titrated extract) ที่ประกอบด้วยสาร 3 ชนิด คือ asiaticoside, asiatic acid และ madecassic acid นั้นมีฤทธิ์สมานแผล โดยจะเพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อประสาน และเพิ่มปริมาณคอลลาเจนในหนูแรท นอกจากนั้นยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเซลล์ human fibroblast ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดและเนื้อเยื่อประสานในบริเวณที่เนื้อเยื่อถูกทำลาย (Coldren และคณะ, 2003) จากการศึกษาสารสกัดน้ำจากบวบกั้งในรูปครีม ซี้ผึ้งและเจล โดยใช้ทาที่แผลของหนูแรท 3 ครั้งต่อวัน นาน 24 วัน พบว่าสารสกัดน้ำจากบวบกั้ง ในรูปเจลมีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของเยื่อผิวหนัง เพิ่มการสร้างคอลลาเจนและเพิ่ม tensile strength ได้มากขึ้นซึ่งให้ผลดีกว่าซี้ผึ้งและครีม (Sunikumar และคณะ, 1998)

2.4 สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

เนื่องจากสมุนไพรมีความแปรปรวนของสารสำคัญสูง ทำให้การออกฤทธิ์ไม่แน่นอน ซึ่งเป็นปัญหาต่อการนำไปประยุกต์ใช้และการวิจัยในเนื้องอก เพื่อจัดปัญหาดังกล่าวคณะผู้วิจัยในคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้เตรียมสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ให้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวนวล และสามารถควบคุมให้มีปริมาณสารสำคัญ คือ triterpenoid glycosides ไม่น้อยกว่า 85% มีอัตราส่วนของ madecassoside (53%) ต่อ asiaticoside (32%) อยู่ในช่วง $1.5 \pm 0.5:1$ (Tantisira, 2008) ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

2.4.1 ผลการศึกษาทางด้านพิษวิทยาของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีความเป็นพิษต่ำ โดยเมื่อป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในขนาด 10 ก./กก. ให้หนูเมาส์เพียงครั้งเดียวในการศึกษาถึงความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและการป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในขนาด 10-1000 มก./กก. แก่หนูแรทเป็นเวลา 3 เดือนติดต่อกันนั้นในการศึกษาถึงความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง พบว่าไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (Chivapat และคณะ, 2011)

2.4.2 ผลการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะความจำบกพร่องจากการถูกเหนี่ยวนำด้วย β -amyloid พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 10 และ 30 มก./กก. สามารถลดภาวะความจำบกพร่องดังกล่าวได้ และ อีซีเอ 233 ในขนาด 30 มก./กก. จะให้ผลได้ดีกว่าในขนาด 10 มก./กก. (Kam-eg, 2009)

จากการศึกษาของ กรณิศ วรณรัตน์ (2552) พบว่า เจลสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ให้โดยการทา มีฤทธิ์ช่วยเร่งกระบวนการสลายแผ่นใหม่ทั้งในหนูแรทปกติและหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน โดยขนาดของแผ่นในหนูแรทที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233

จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 และจากการศึกษาแผลกรีดในหนูแรพปกติและหนูแรพที่ถูกเหนียวนำให้เป็นเบาหวาน พบว่า เจลสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาดความเข้มข้น 0.05% โดยการทา จะช่วยเร่งการสมานแผลกรีดที่เกิดขึ้นในหนูทั้งสองกลุ่มได้ โดยมีผลไปกระตุ้นการสร้างผิวหนังใหม่ เพิ่มความหนาของชั้นผิวหนังกำพร้า (epidermal thickness) และมีผลเพิ่มแรงดึงสูงสุดที่ทำให้ผิวหนังแยกจากกัน (tensile strength) (หทัยชนก ทันอินทรอาจ, 2552) นอกจากนี้ ในการศึกษาเบื้องต้นของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในรูปของยาป้ายปากต่อโรคแผลร้อนในชนิดไม่รุนแรง พบว่าอาสาสมัครที่ได้รับยาป้ายปากที่มี อีซีเอ 233 ในขนาดความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.20 สามารถลดขนาดแผลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 2, 6 และ 4 ตามลำดับ (ชลันดากร เรืองประเสริฐกิจ, 2553)

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ให้ทางปากต่อการหายของแผลเปิดในหนูแรพที่เป็นเบาหวาน พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 5, 10, 30 และ 60 มก./กก. ที่ให้ทางปาก แก่หนูเบาหวานไม่ช่วยเร่งการหดตัวของแผลเปิด แต่ อีซีเอ 233 ในขนาด 30 มก./กก. ช่วยให้เกิดโครงสร้างของผิวหนังที่สร้างขึ้นใหม่นั้นมีความสมบูรณ์และมีความแข็งแรงมากขึ้น นอกจากนี้ อีซีเอ 233 ขนาด 5, 30 และ 60 มก./กก. ยังมีผลชะลอการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในกระแสเลือดในหนูเบาหวานอีกด้วย (ทอแสง วีระกุล, 2553)

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อความสามารถของการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ปกติและหนูเมาส์ที่มีความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำจากภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 30 มก./กก. ทางปาก ทำให้มีการเรียนรู้และความจำดีขึ้น ทั้งในหนูปกติและหนูที่มีภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบด้วยวิธีมอริสวอเตอร์เมสและสะเต็ปดาว รวมถึงลดระดับเอ็มดีเอทีสูงขึ้นจากภาวะสมองขาดเลือดและเพิ่มกลูตาไธโอนในสมอง (ยุทพร สุขวิชัย, 2553)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนักระหว่าง 100-150 กรัม และหนูเมาส์เพศผู้ สายพันธุ์ ICR น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม แล้วนำมาเลี้ยงในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย 3-5 วัน ก่อนทำการทดลอง มีการควบคุมสลับเวลามืดและสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์และน้ำโดยไม่จำกัด โดยจะงดอาหารอย่างน้อย 1-2 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ ภายหลังเสร็จสิ้นการวิจัยสัตว์ทดลองทั้งหมดจะถูกทำการุณยฆาตด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือ

- Plethysmometer (Ugo basile)
- Tail-flick analgesiometer (Harvard apparatus)
- Hot-plate analgesiometer (Harvard apparatus)
- vortex mixer (Scientific industries)
- stomach tube No.16, 20
- needle No.26, 30
- syringe 1 ml
- syringe 3 ml
- เครื่องชั่ง
- นาฬิกาจับเวลา

3.2.2 สารเคมี

- standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 (ECa 233)
- morphine ชนิดผง จาก Thai FDA company
- naloxone จาก Sigma chemical company
- carrageenan จาก Sigma chemical company
- prostaglandin E₂ จาก Sigma chemical company
- acetic acid จาก Merck chemicals company
- indomethacin จาก Sigma chemical company
- 0.9% normal saline solution (NSS)
- 0.5% carboxymethylcellulose จาก Sigma chemical company

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารเคมี

สารสกัดมาตรฐานบัวบก คีซีเอ 233 (madecassoside : asiaticoside)

	10-300 มก./กก. แขนงลอยใน 0.5% CMC
morphine sulphate (MO)	10 มก./กก. ละลายใน NSS
naloxone (NAL)	5 มก./กก. ละลายใน NSS
1% carrageenan solution	0.1 มล/หนูแรท ละลายใน NSS
1µg/ml prostaglandin E ₂ (PGE ₂) solution	0.1 มล/หนูแรท ละลายใน NSS
0.6% acetic acid solution	10 มล./กก. ละลายใน NSS
indomethacin (IND)	10 มก./กก. ละลายใน NSS
0.5% carboxymethylcellulose (0.5% CMC)	10 มล./กก. ละลายใน sterile water

3.3.2 วิธีการทดลอง

3.3.2.1 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของ สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 เปรียบเทียบกับยาระงับปวดมาตรฐาน

3.3.2.1.1 Mouse Hot-plate test

หลักการ การทดสอบนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Woolfe และ MacDonald ในปี 1944 ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบ สารที่มีฤทธิ์ระงับปวดต่อระบบประสาทส่วนกลาง ในระดับเหนือไขสันหลัง (supraspinal) และไขสันหลัง (spinal) โดยอาศัยการประเมินพฤติกรรม 2 แบบ ได้แก่ การยกเท้าหลังขึ้นมาเลียและการกระโดดอย่างรุนแรง โดยหนูแต่ละตัวจะถูกวางลงบน hot-plate surface ขนาด 28x28 เซนติเมตร ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 55 ± 0.5 องศาเซลเซียส ครอบด้วยแก้วใส (plexiglas wall cylinder) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ทำการจับเวลาและสังเกตพฤติกรรมการเลียขู่เท้าหลัง หรือกระโดดอย่างรุนแรง ซึ่งถือว่าเป็น end point ที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้ พร้อมทั้งบันทึกเวลาที่สัตว์ทดลองแสดงพฤติกรรมนั้น

วิธีทดลอง ใช้หนูเม้าส์เพศผู้ สายพันธุ์ ICR น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม โดยแบ่งหนูออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ทำ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกัน 10 นาที โดยมี cut-off time ที่ 45 วินาทีเพื่อป้องกันอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง หลังการทำ pre-drug baseline trial ครั้งที่ 3 แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบต่างๆ โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ 0.9% normal saline solution ขนาด 10 มล./กก. และ morphine ขนาด 10 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ตามลำดับ กลุ่มที่ 3-8 จะได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน ตามลำดับ แล้วทำการทดสอบเพื่อหาค่า post-drug latency (TL) ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาทีหลังให้สารทดสอบ รายงานผลการทดสอบเป็นค่า mean percentage of maximum possible effect (%MPE) ของหนูแต่ละตัว โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

วิธีคำนวณ

- หาค่า BL (baseline latency) ของหนูแต่ละตัวได้จากการนำ pre-drug baseline ครั้งที่ 2 และ 3 มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้เป็น baseline ของหนูตัวนั้นๆ จากสูตร

$$\text{mean of BL} = \frac{(\text{BL ครั้งที่ 2} + \text{BL ครั้งที่ 3})}{2}$$

- หาค่า % MPE (mean percent maximum possible effect) ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลาจากสูตร

$$\% \text{ MPE} = \left[\frac{(\text{TL} - \text{BL})}{(\text{cut-off time} - \text{BL})} \right] \times 100$$

TL = test latency, BL = baseline latency, cut-off time = 45 วินาที

- นำ % MPE ที่ได้มาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม โดยใช้หลักการ trapezoidal rule ซึ่งพื้นที่ใต้กราฟที่ได้คือ area of analgesia



รูปที่ 3.1 Hot-plate analgesiometer (Harvard apparatus)

3.3.2.1.2 การทดสอบผลของ naloxone ต่อฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ด้วยวิธี Hot-plate test

Opioid receptor pathway

หลักการ เพื่อศึกษาว่าฤทธิ์ระงับปวดของ อีซีเอ 233 เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ผ่าน opioid receptor หรือไม่ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Somchai ในปี 2004

วิธีทดลอง ใช้หนูเม้าส์เพศผู้ สายพันธุ์ ICR น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม โดยแบ่งหนูเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ 0.9% normal saline solution ขนาด 10 มล./กก. และ naloxone ขนาด 5 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง กลุ่มที่ 3 และ 4 จะได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน กลุ่มที่ 5 ได้รับ naloxone ขนาด 5 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง 15 นาที ก่อนได้รับ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน แล้วนำหนูมาทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วยวิธี Hot-plate test

3.3.2.1.3 Mouse Tail-flick test

หลักการ การทดสอบนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ D'Amour และ Smith ในปี 1941 ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบ สารที่มีฤทธิ์ระงับปวดต่อระบบประสาทส่วนกลาง ในระดับไขสันหลัง (spinal) โดยประเมินจากการสับัดหางหนีลำแสงความเข้มสูงที่ส่องลงมาบนหาง หนูแต่ละตัวจะถูกใส่ไว้ใน plexiglas restrainer ที่หางหนูสามารถลอดออกมาได้ ระบายหางหนูด้วยปากกาสีดำ ให้มีขนาดยาว 1 เซนติเมตรที่ตำแหน่ง 4 เซนติเมตรจากปลายหาง นำหางหนูไปวางลงบน Tail-flick analgesimeter ซึ่งตั้งความเข้มของแสงคงที่ที่ 3.7 °A ให้ตำแหน่งที่แสงส่องผ่านอยู่ตรงกลางของส่วนที่ทำเครื่องหมายไว้ สังเกตและบันทึกเวลาที่หนูสับัดหางออกจากลำแสง

วิธีทดลอง ใช้หนูเมาส์เพศผู้ สายพันธุ์ ICR น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม โดยแบ่งหนูออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ทำ pre-drug baseline trials 3 ครั้งห่างกัน 10 นาที โดยมี cut-off time ที่ 4 วินาทีเพื่อป้องกันอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง หลังการทำ pre-drug baseline trial ครั้งที่ 3 แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบต่างๆ โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ 0.9% normal saline solution ขนาด 10 มล./กก. และ morphine ขนาด 10 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ตามลำดับ กลุ่มที่ 3-8 จะได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน ตามลำดับ แล้วทำการทดสอบเพื่อหาค่า post-drug latency (TL) ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาทีหลังให้สารทดสอบ รายงานผลการทดสอบเป็นค่า mean percentage of maximum possible effect (%MPE) ของหนูแต่ละตัว โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

วิธีคำนวณ

- หาค่า BL (baseline latency) ของหนูแต่ละตัวได้จากการนำ pre-drug baseline ครั้งที่ 2 และ 3 มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้เป็น baseline ของหนูตัวนั้นๆ จากสูตร

$$\text{mean of BL} = \frac{(\text{BL ครั้งที่ 2} + \text{BL ครั้งที่ 3})}{2}$$

- หาค่า % MPE (mean percent maximum possible effect) ของหนูแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลาจากสูตร

$$\% \text{ MPE} = \left[\frac{(\text{TL} - \text{BL})}{(\text{cut-off time} - \text{BL})} \right] \times 100$$

TL = test latency, BL = baseline latency, cut-off time = 4 วินาที

- นำ % MPE ที่ได้มาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม โดยใช้หลักการ trapezoidal rule ซึ่งพื้นที่ใต้กราฟที่ได้คือ area of analgesia



รูปที่ 3.2 Tail-flick analgesiometer (Harvard apparatus)

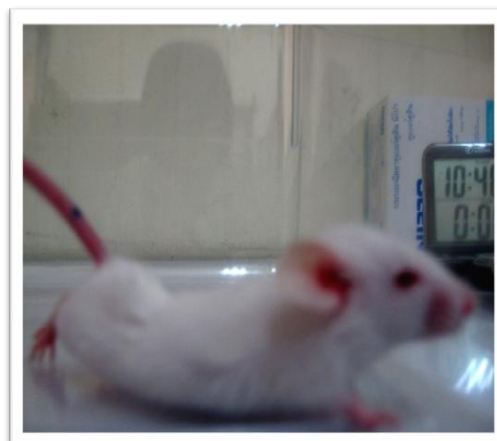
3.3.2.1.4 Acetic acid-induced writhing test

หลักการ การทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Koster และคณะ ในปี 1959 เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบสารที่มีฤทธิ์ระงับปวดต่อระบบประสาทส่วนปลาย โดยเฉพาะ visceral inflammatory pain โดยเหนี่ยวนำให้หนูเกิดความปวดด้วยการฉีดสารที่ทำให้เกิดการระคายเคือง เช่น phenylquinone หรือ acetic acid เข้าไปในช่องท้องของหนู หนูจะแสดงพฤติกรรมที่มีลักษณะเฉพาะที่เรียกว่า writhing คือการบิดงอลำตัว เอาท้องถูแนบไปกับพื้น และการเหยียดขาหลังอย่างน้อย 1 ข้าง

วิธีทดลอง ใช้หนูเมาส์เพศผู้ สายพันธุ์ ICR น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม โดยแบ่งหนูออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบต่างๆ โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ 0.9% normal saline solution ขนาด 10 มล./กก. และ indomethacin ขนาด 10 มก./กก. โดยการป้อนตามลำดับ กลุ่มที่ 3-8 ได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อนตามลำดับ หลังจากนั้น 30 นาที จะฉีด 0.6% acetic acid ในปริมาตร 10 มล./กก. เข้าทางช่องท้องของหนู แล้วบันทึกจำนวนครั้งของการเกิด writhing ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที และระยะเวลาเป็นนาทีหลังจากฉีด acetic acid จนกระทั่งหนูเกิด writhing (latency time) รายงานฤทธิ์ระงับปวดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด writhing (% inhibition of writhing) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่ง % inhibition of writhing คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ inhibition of writhing} = \left[\frac{Wr (\text{control}) - Wr (\text{test})}{Wr (\text{control})} \right] \times 100$$

; Wr = mean number of writhing



รูปที่ 3.3 การเกิด writhing response

3.3.2.1.5 การทดสอบผลของ naloxone ต่อฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ด้วยวิธี acetic acid-induced writhing test

Opioid receptor pathway

หลักการ เพื่อศึกษาว่าฤทธิ์ระงับปวดของ อีซีเอ 233 เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ผ่าน opioid receptor หรือไม่ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Somchai ในปี 2004

วิธีทดลอง ใช้หนูเม้าส์เพศผู้ สายพันธุ์ ICR น้ำหนักระหว่าง 18-25 กรัม โดยแบ่งหนูเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 จะได้รับ naloxone ขนาด 5 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง 15 นาทีก่อนได้รับ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน แล้วนำหนูมาทดสอบฤทธิ์ระงับปวด ด้วยวิธี acetic acid-induced writhing test

3.3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบมาตรฐาน

3.4.2.2.1 Carrageenan-induced paw edema

หลักการ การทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Winter และคณะในปี 1962 ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยดูจากความสามารถในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้า หลังด้านขวาของหนูแรทหลังจากฉีดสารที่ทำให้เกิดการระคายเคืองเช่น yeast, carrageenan เข้าไปในบริเวณใต้ฝ่าเท้า ในการทดลองนี้จะใช้ carrageenan เป็นตัวกระตุ้นการอักเสบ การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบจะดูจากปริมาตรของอุ้งเท้าที่ถูกฉีดโดยวัดปริมาตรทั้งก่อนและหลังฉีด carrageenan ถ้าสารทดสอบสามารถลดการบวมของอุ้งเท้าได้ แสดงว่าสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

วิธีทดลอง ใช้หนูแรท เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนักระหว่าง 100-150 กรัม แบ่งหนูเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว นำหนูไปวัดปริมาตรของอุ้งเท้าหลังเพื่อใช้เป็น baseline ของปริมาตรอุ้งเท้า แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบ โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ 0.9% normal saline solution ขนาด 10 มล./กก. และ indomethacin ขนาด 10 มก./กก. โดยการป้อนตามลำดับ กลุ่มที่ 3-6 ได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อนตามลำดับ หลังให้สารทดสอบ 1 ชั่วโมง จะทำการกระตุ้นให้ทำหนูเกิดการบวมโดยการฉีด 1% carrageenan ปริมาตร 0.1 มล. เข้าบริเวณใต้ฝ่าเท้าหลังด้านขวา ซึ่งขีดเส้นรอบข้อเท้าที่บริเวณ lateral malleolus แล้ววัดปริมาตรของอุ้งเท้าโดยใช้เครื่อง plethysmometer ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมงหลังจากฉีด 1% carrageenan แล้วประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยดูจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ inhibition of edema} = 100 (1 - V_t / V_c)$$

V_t คือ ปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าในกลุ่มควบคุม

V_o คือ ปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ



รูปที่ 3.4 Plethysmometer (Ugo basile)

3.4.2.2.2 การทดสอบผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย prostaglandin E₂

Prostaglandin E₂-induced paw edema

หลักการ การทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Somchai ในปี 2004 เนื่องจาก carrageenan เหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าหนูเกิดการอักเสบ ซึ่งมีลักษณะเป็น biphasic โดยใน phase 1 ของการอักเสบจะเกิดจากการหลั่งของ histamine และ serotonin ส่วนใน phase 2 จะเกี่ยวข้องกับการหลั่งของ prostaglandins ดังนั้นการศึกษามผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย prostaglandins E₂ จะทำให้ทราบผลการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารทดสอบที่ชัดเจนเพิ่มขึ้น

วิธีทดลอง ใช้หนูแรท เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนักระหว่าง 100-150 กรัม แบ่งหนูเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว นำหนูไปวัดปริมาตรของอุ้งเท้าหลังเพื่อใช้เป็น baseline ของปริมาตรอุ้งเท้า แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบ โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ 0.9% normal saline solution ขนาด 10 มล./กก. และ indomethacin ขนาด 10 มก./กก. โดยการป้อนตามลำดับ กลุ่มที่ 3 และ 4 จะได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อนตามลำดับ หลังจากนั้นทำการทดลองคล้ายกับวิธี carrageenan-induced paw edema แต่สำหรับวิธี prostaglandin E₂-induced paw edema จะใช้ 1 µg/ml prostaglandin E₂ ปริมาตร 0.1 มล. แทนการฉีดด้วย 1% carrageenan

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard error of the means; S.E.M.) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ และกลุ่มควบคุมโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย *Tukey's honest significance test* พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 เปรียบเทียบกับยาระงับปวดมาตรฐาน

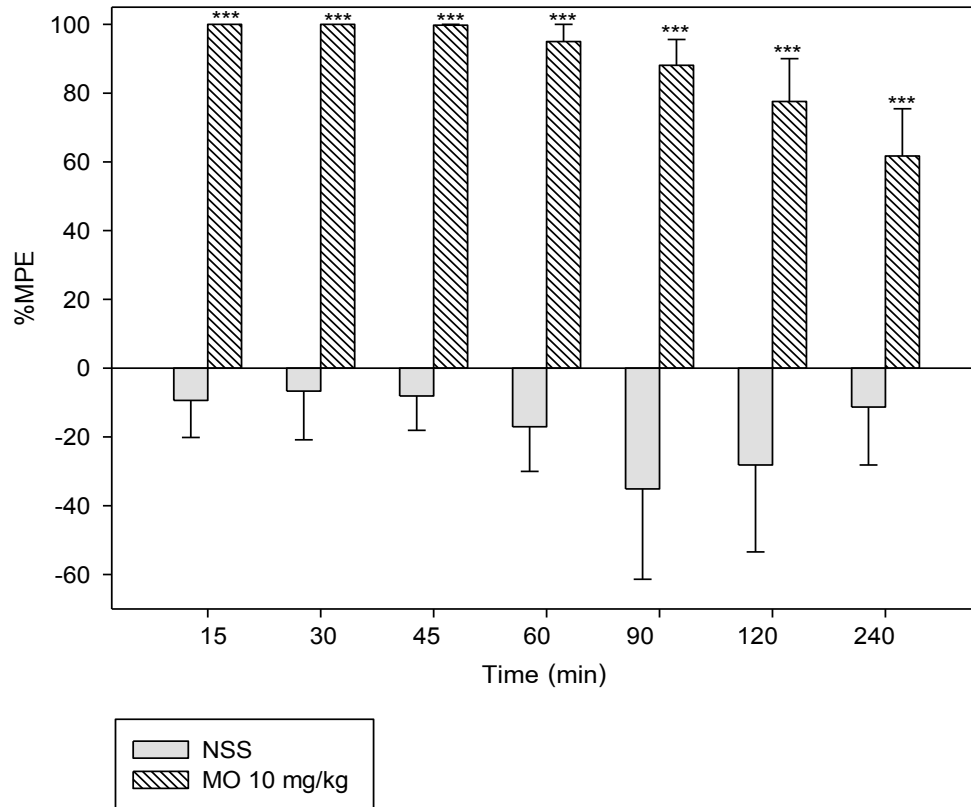
4.1.1 Mouse Hot-plate test

ผลการทดลอง พบว่า หนู กลุ่มที่ได้รับ morphine (MO) ขนาด 10 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูทนความร้อนสูงกว่า กลุ่มควบคุมที่ได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อคำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับ เวลา โดยค่าที่ได้ เท่ากับ 18793.55 ± 1362.71 %MPE-min และ -4585.88 ± 3992.87 %MPE-min ตามลำดับ โดยระยะเวลาในการออกฤทธิ์ระงับปวดของ morphine เริ่มตั้งแต่ 15 นาที ไปจนถึง 240 นาที ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

นอกจากนั้นเมื่อ เปรียบเทียบระหว่าง หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำกระสายยา (0.5% CMC) กับ หนูกลุ่มที่ได้รับ อีซีเอ 233 ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 ในขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูทนความร้อนสูงกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า area of analgesia เท่ากับ 9230.93 ± 1754.80 %MPE-min ($p < 0.001$), 8119.34 ± 1633.83 %MPE-min ($p < 0.001$) และ 13585.30 ± 1116.72 %MPE-min ($p < 0.001$) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูทนความร้อนสูงกว่ากลุ่ม ที่ได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูทนความร้อนสูงกว่ากลุ่ม ที่ได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 100 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.4

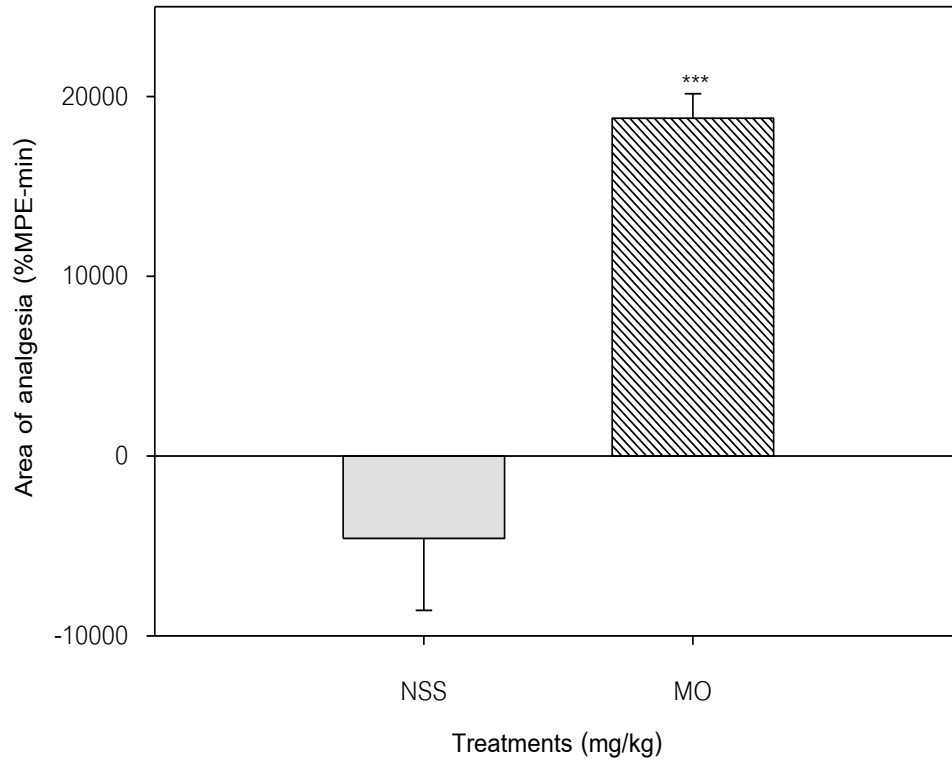
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. มีฤทธิ์ระงับความเจ็บปวด โดยระยะเวลาในการออกฤทธิ์ระงับ ความเจ็บปวดเริ่มตั้งแต่ 15 นาที ไปจนถึง 240 นาที และการตอบสนองของ อีซีเอ 233 ที่เวลาต่างๆ (15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาที) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.3

Mouse Hot-plate test



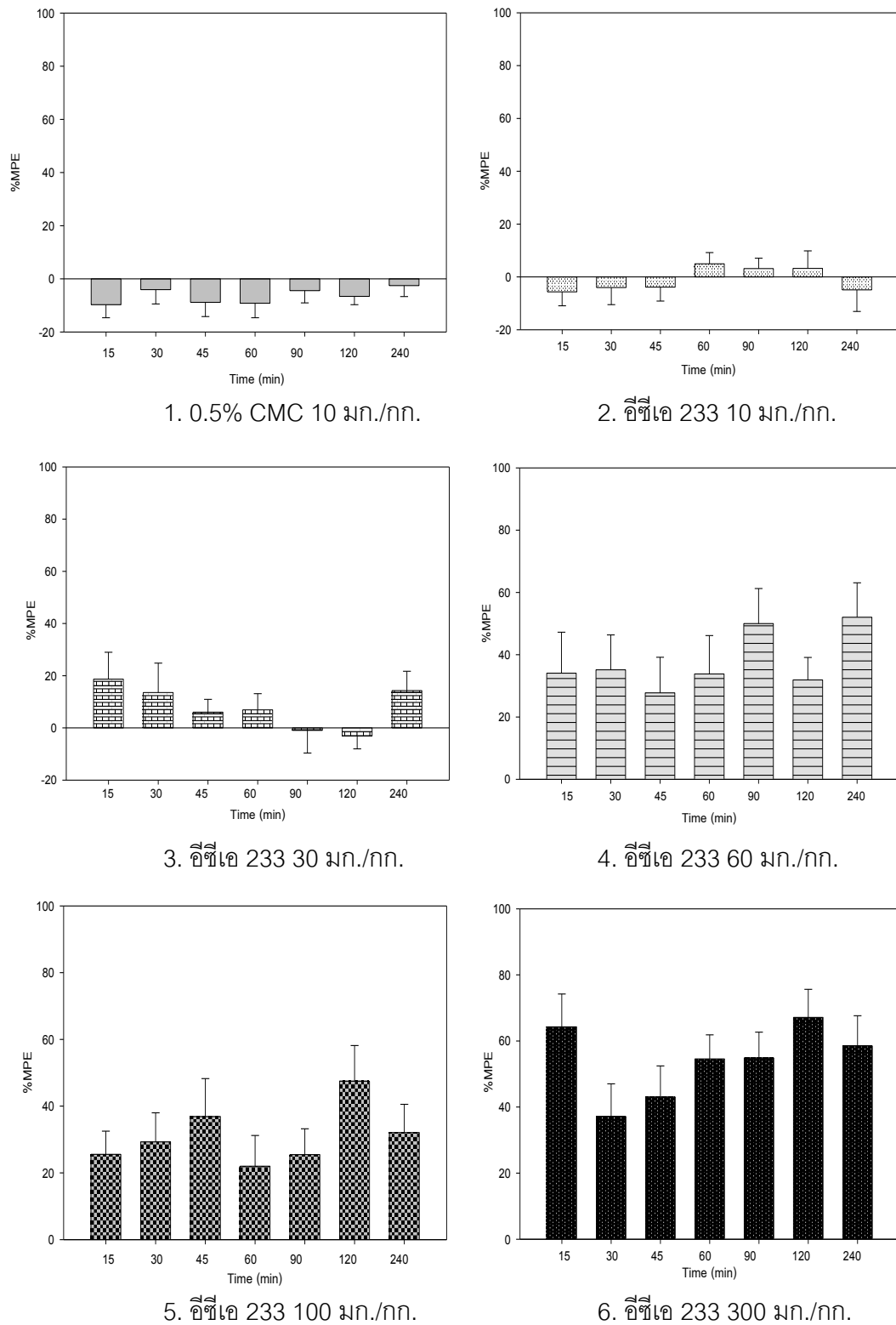
รูปที่ 4.1 การตอบสนองของหนูเมาส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับเวลา (นาที)) ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. และ morphine (MO) ขนาด 10 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (n=10)
 *** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

Mouse Hot-plate test



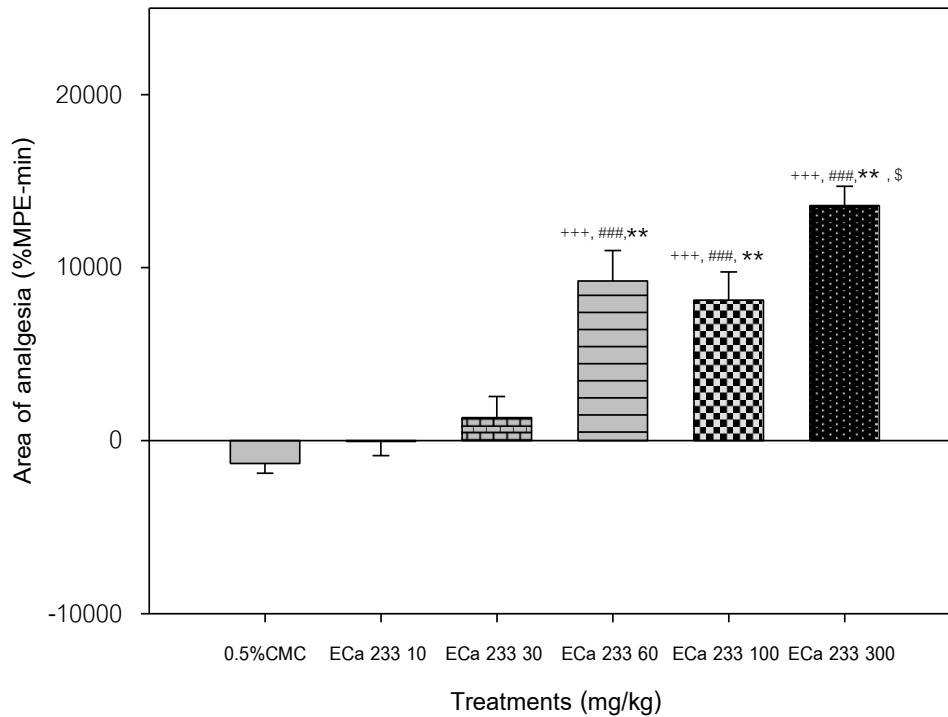
รูปที่ 4.2 พื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเมาส์ ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. และ morphine (MO) ขนาด 10 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (n=10)
*** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

Mouse Hot-plate Test



รูปที่ 4.3 การตอบสนองของหนูเม้าส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับ เวลา (นาที)) ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ คีซีไอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก. โดยการป้อน (n=10)

Mouse Hot-plate Test



รูปที่ 4.4 พื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเมาส์ ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก. โดยการป้อน (n=10)

+++ $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

$p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ อีซีเอ 233 10 มก./กก.

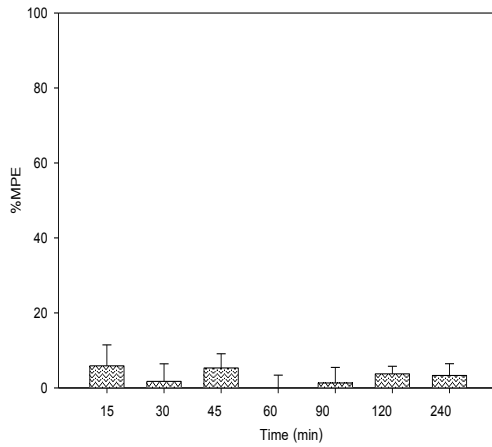
** $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ อีซีเอ 233 30 มก./กก.

\$ $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ อีซีเอ 233 100 มก./กก.

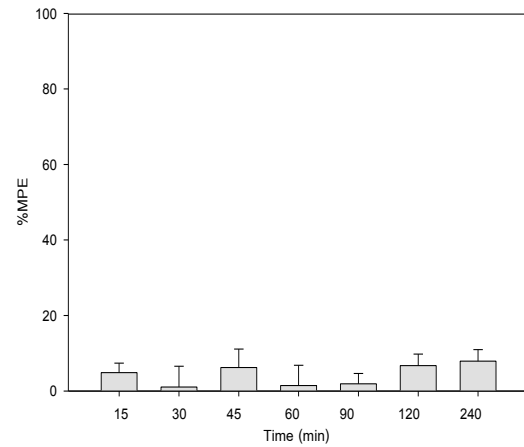
4.1.2 ผลของ naloxone ต่อฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในการทดสอบด้วยวิธี Hot-plate test

ผลการทดลองพบว่า ฤทธิ์ระงับปวดของอีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. ถูกยับยั้งได้ด้วย naloxone (NAL) ขนาด 5 มก./กก. ซึ่งเป็น opioid antagonist ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.6 แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดของอีซีเอ 233 อาจเกี่ยวข้องกับตัวรับ opioid receptor และการตอบสนองของสารทดสอบชนิดต่างๆ ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาที แสดงไว้ในรูปที่ 4.5

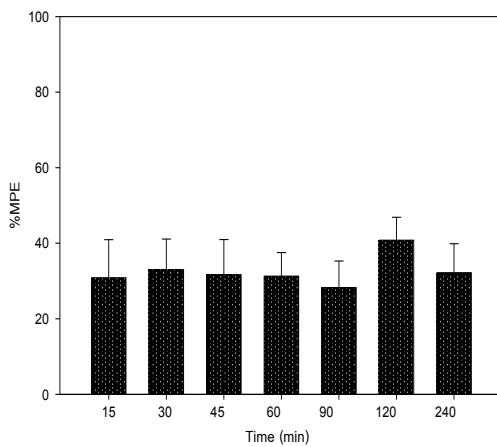
Mouse Hot-plate Test



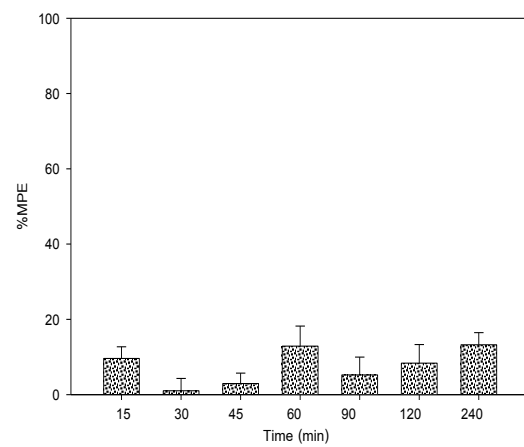
1. naloxone 5 มก./กก.



2. 0.5% CMC 10 มก./กก.



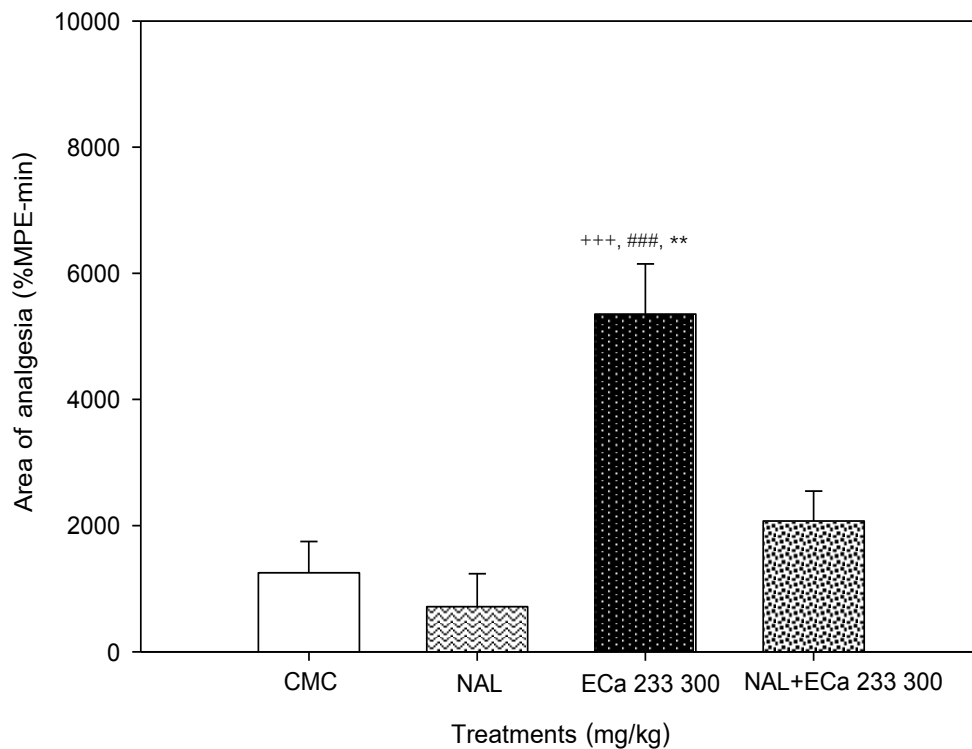
3. อีซีเอ 233 300 มก./กก.



4. naloxone+อีซีเอ 233 5/300 มก./กก.

รูปที่ 4.5 การตอบสนองของหนูเมาส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับ เวลา (นาที)) ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ naloxone (NAL) ขนาด 5 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน และได้รับ naloxone ร่วมกับ อีซีเอ 233 (n=10)

Mouse Hot-plate Test



รูปที่ 4.6 พื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเมาส์ ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ naloxone (NAL) ขนาด 5 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ได้รับ 0.5%CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน และได้รับ naloxone ร่วมกับ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. (n=10)
⁺⁺⁺ $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC
^{###} $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NAL
^{**} $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NAL+อีซีเอ 233

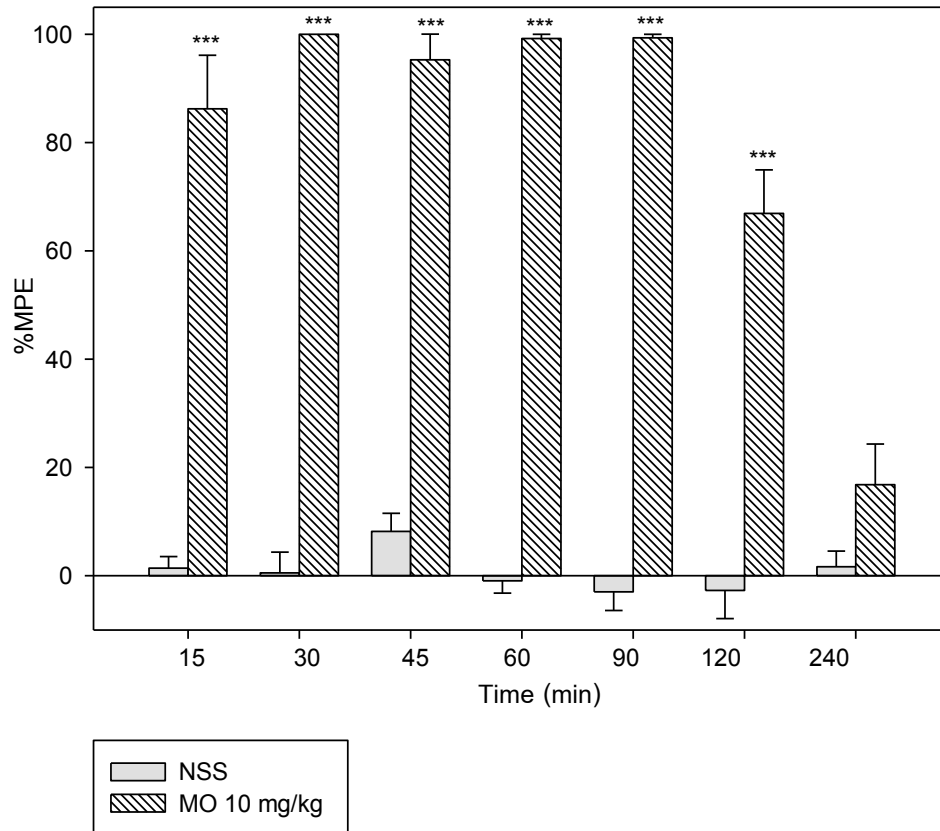
4.1.3 Mouse Tail-flick test

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ morphine (MO) ขนาด 10 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูทนความร้อนสูงกว่า กลุ่มควบคุมที่ได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อคำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับ เวลา โดยค่าที่ได้ เท่ากับ 15461.03 ± 942.02 %MPE-min และ -59.89 ± 633.29 %MPE-min ตามลำดับ โดยระยะเวลาในการออกฤทธิ์ระงับปวดของ morphine เริ่มตั้งแต่ 15 นาที ไปจนถึง 120 นาที ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.7 และ รูปที่ 4.8

นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำกระสายยา (0.5% CMC) กับหนูกลุ่มที่ได้รับ อีซีเอ 233 ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 ในขนาด 100 และ 300 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูทนความร้อนสูงกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับขนาดยา โดยมีค่า area of analgesia เท่ากับ 4147.36 ± 840.82 %MPE-min ($p < 0.05$) และ 6334.49 ± 1650.82 %MPE-min ($p < 0.001$) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูทนความร้อนสูงกว่ากลุ่ม ที่ได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 10, 30 และ 60 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.10

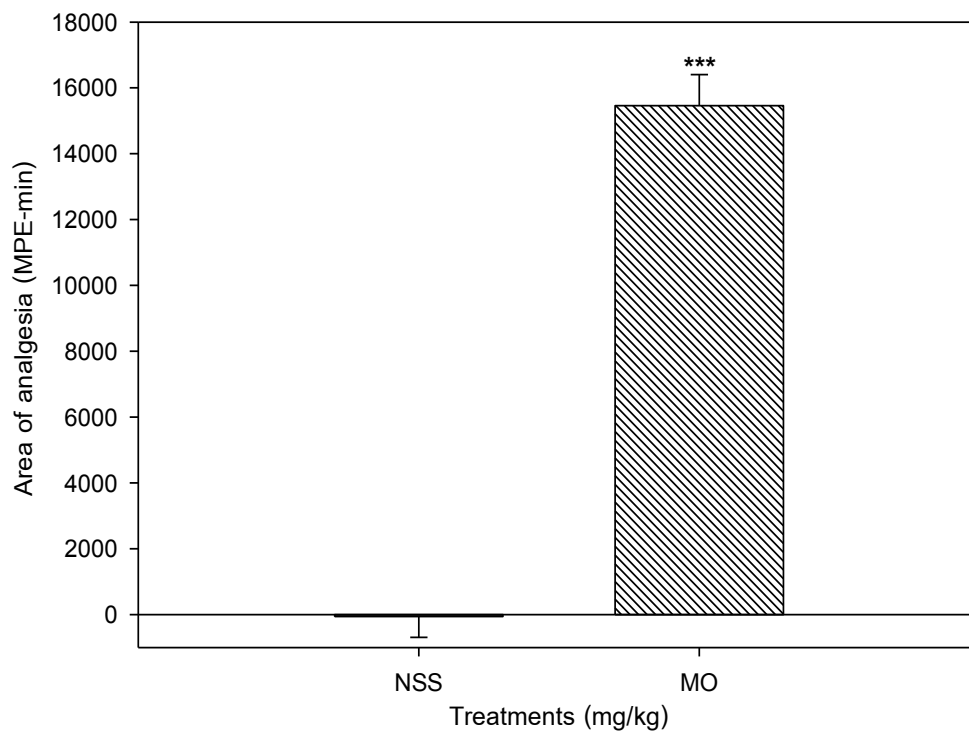
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 100 และ 300 มก./กก. มีฤทธิ์ระงับความเจ็บปวด โดยระยะเวลาในการออกฤทธิ์ระงับ ความเจ็บปวดเริ่มตั้งแต่ 15 นาที ไปจนถึง 240 นาที และการตอบสนองของ อีซีเอ 233 ที่เวลาต่างๆ (15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาที) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.9

Mouse Tail-flick test



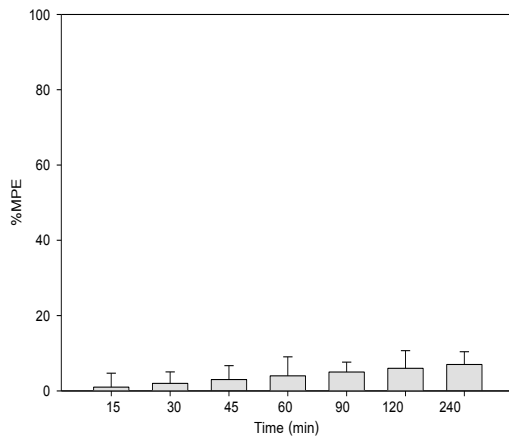
รูปที่ 4.7 การตอบสนองของหนูเมาส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับเวลา นาที) ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. และ morphine (MO) ขนาด 10 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (n=10)
 *** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

Mouse Tail-flick test

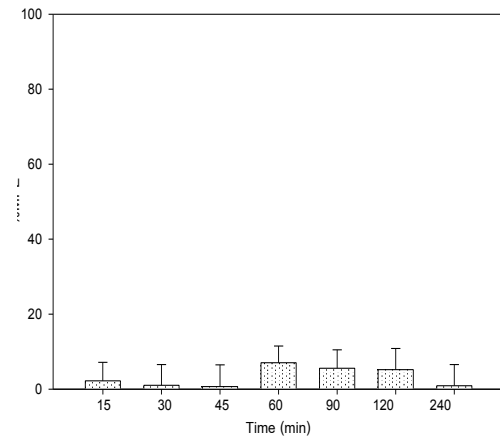


รูปที่ 4.8 พื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเมาส์ ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. และ morphine (MO) ขนาด 10 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (n=10)
*** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

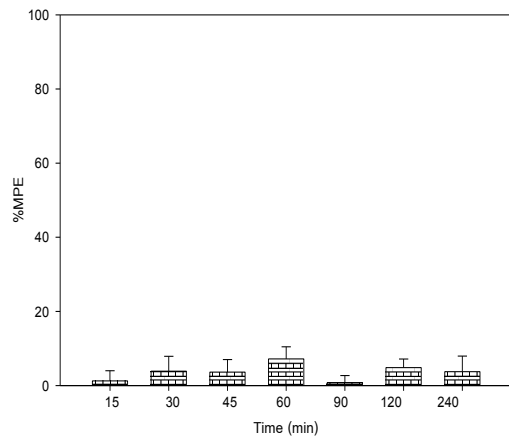
Mouse Tail-flick test



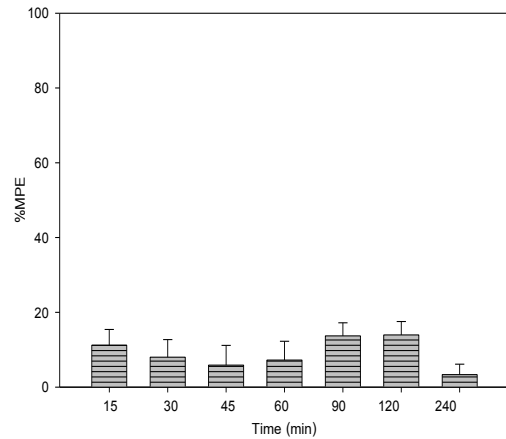
1. 0.5% CMC 10 มก./กก.



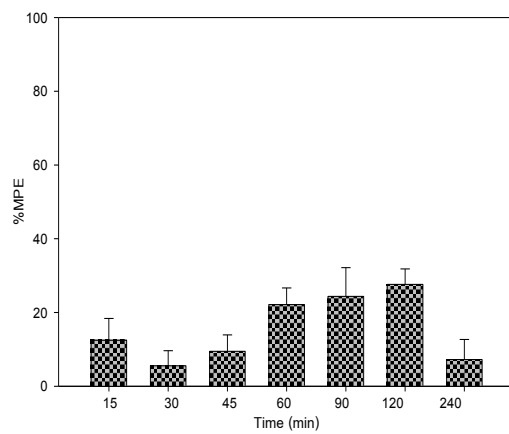
2. อีซีไอ 233 10 มก./กก.



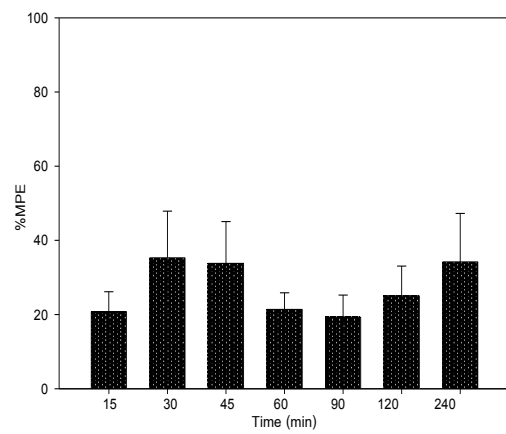
3. อีซีไอ 233 30 มก./กก.



4. อีซีไอ 233 60 มก./กก.



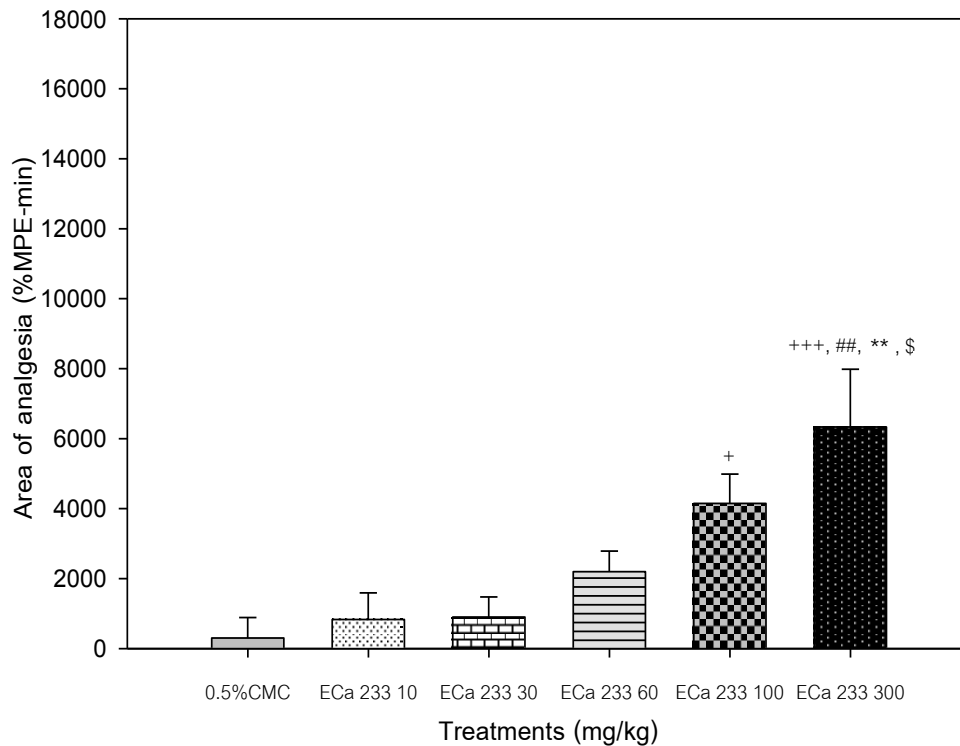
5. อีซีไอ 233 100 มก./กก.



6. อีซีไอ 233 300 มก./กก.

รูปที่ 4.9 การตอบสนองของหนูเม้าส์ที่เวลาต่างๆ (%MPE กับ เวลา (นาที)) ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ อีซีไอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก. โดยการป้อน (n=10)

Mouse Tail-flick test



รูปที่ 4.10 พื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเมาส์ ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ อีซีไอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก. โดยการป้อน (n=10)

⁺ $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

⁺⁺⁺ $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

^{##} $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอีซีไอ 233 10 มก./กก.

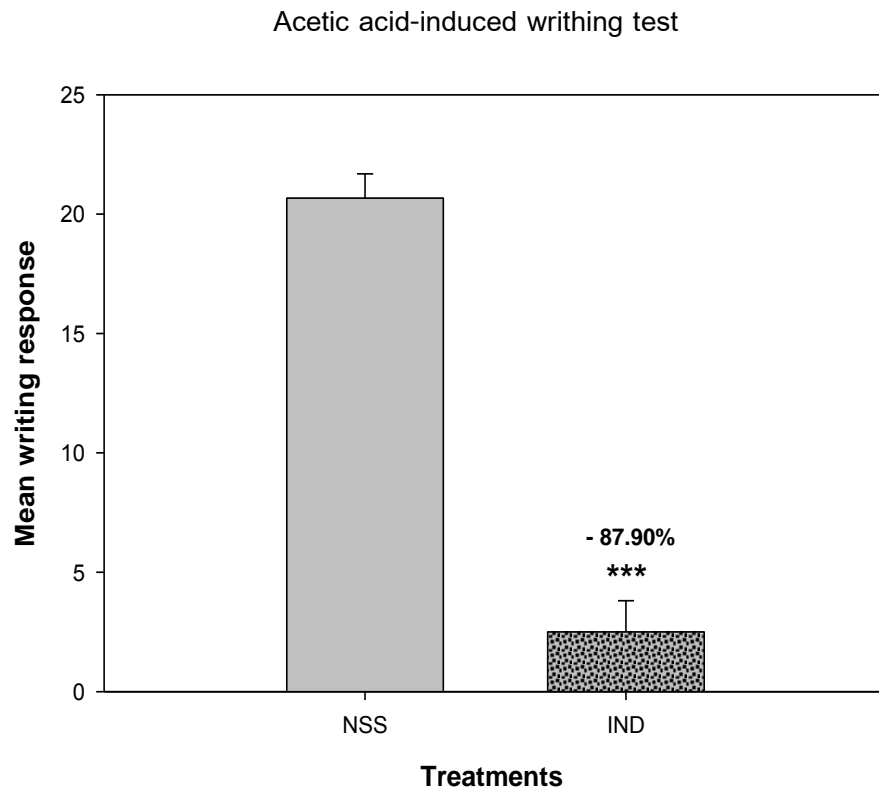
^{**} $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอีซีไอ 233 30 มก./กก.

^{\$} $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ อีซีไอ 233 60 มก./กก.

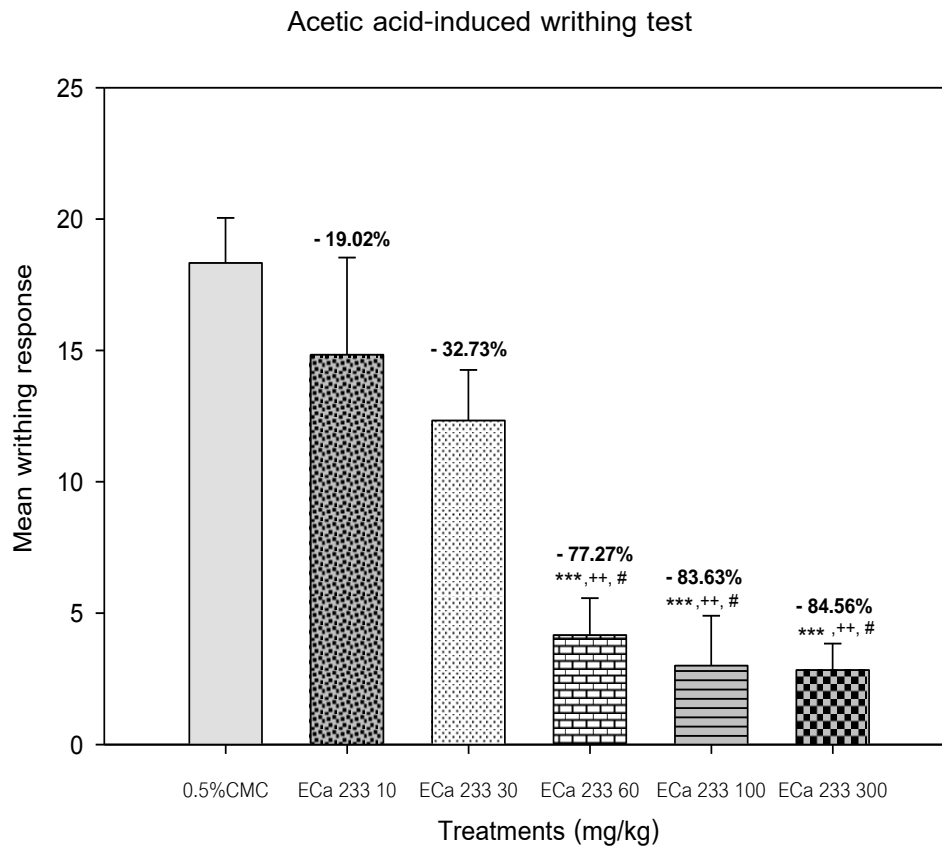
4.1.4 Acetic acid-induced writhing test

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ indomethacin (IND) ขนาด 10 มก./กก. โดยการป้อน สามารถลดจำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด writhing เท่ากับ 87.90% และจำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing เท่ากับ 2.5 ± 1.31 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.11

นอกจากนั้นเมื่อ เปรียบเทียบระหว่าง หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำกระสายยา (0.5% CMC) กับ หนูกลุ่มที่ได้รับอิซีสเอด 233 ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับอิซีสเอด 233 ในขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. สามารถลดจำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม โดยมีจำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing เท่ากับ 4.17 ± 1.40 , 3.00 ± 1.90 และ 2.83 ± 1.01 ตามลำดับ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด writhing เท่ากับ 77.27%, 83.63% และ 84.56% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับอิซีสเอด 233 ในขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. สามารถลดจำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอิซีสเอด 233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.11 จำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ใน acetic acid-induced writhing test ของหนูเมาส์ หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. และ indomethacin (IND) ขนาด 10 มก./กก. โดยการป้อน (n=6)
*** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS



รูปที่ 4.12 จำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ใน acetic acid-induced writhing test ของหนูเมาส์ หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ อีซีไอ 233 ขนาด 10-300 มก./กก. โดยการป้อน (n=6)

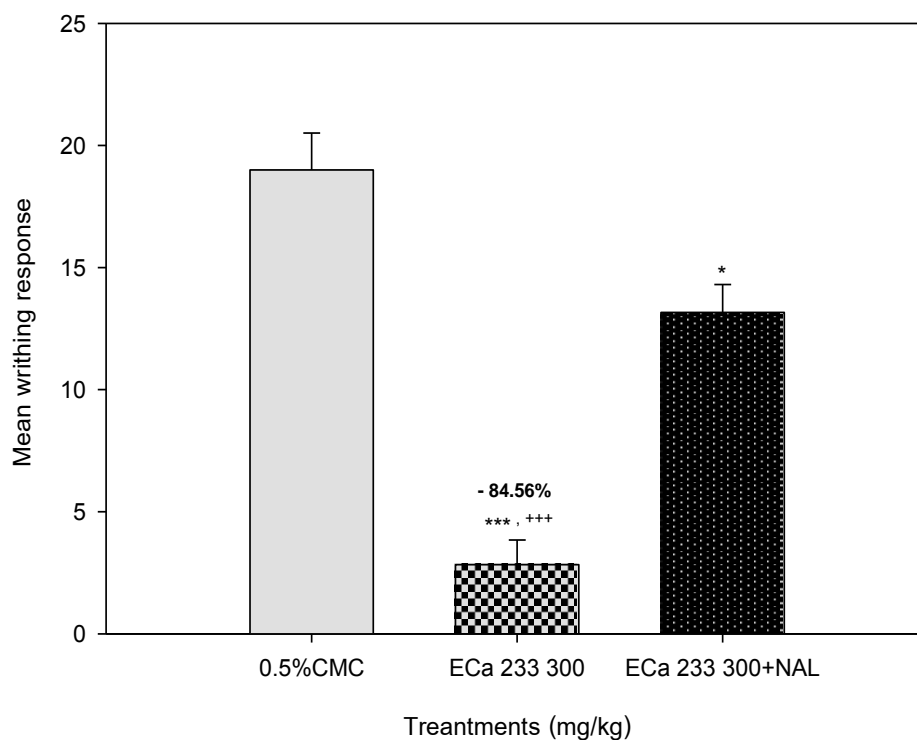
*** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

++ $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอีซีไอ 233 10 มก./กก.

$p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอีซีไอ 233 30 มก./กก.

4.1.5 ผลของ naloxone ต่อฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีไอ 233 ในการทดสอบด้วยวิธี acetic acid-induced writhing test

ผลการทดลองพบว่า ฤทธิ์ระงับปวดของอีซีไอ 233 ขนาด 300 มก./กก. ถูกยับยั้งได้ด้วย naloxone (NAL) ขนาด 5 มก./กก. ซึ่งเป็น opioid antagonist แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดของอีซีไอ 233 อาจเกี่ยวข้องกับตัวรับ opioid receptor ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 จำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing ใน acetic acid-induced writhing test

ของหนูเมาส์ หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ อีซีไอ 233 ขนาด 300 มก./กก.

โดยการป้อน และได้รับ naloxone (NAL) ขนาด 5 มก./กก. ร่วมกับ อีซีไอ 233

ขนาด 300 มก./กก. (n=6)

* $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

*** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

[§] $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NAL+อีซีไอ 233

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 เปรียบเทียบกับยาระงับปวดมาตรฐาน

4.2.1 Carrageenan-induced paw edema test

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ indomethacin ขนาด 10 มก./กก. สามารถลดการบวมของอุ้งเท้าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดการบวมเท่ากับ 99.61% ซึ่ง การลดการบวมสูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำกระสายยา (0.5 % CMC) และ อีซีเอ 233 ขนาด 60,100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 100 และ 300 มก./กก. สามารถลดการบวมของอุ้งเท้าได้ที่ชั่วโมงที่ 4 ($p < 0.01$) และชั่วโมงที่ 5 ($p < 0.05$) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดการบวมเท่ากับ 83.53% และ 86.67% ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ผลของ indomethacin (IND) ขนาด 10 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan (0.1 มล) ในหนูแรท แสดงเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. (n=6)

treatments	Paw edema \pm S.E.M.(ml)					
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr
NSS 10 mg/kg	0.15 \pm 0.02	0.28 \pm 0.05	0.28 \pm 0.03	0.43 \pm 0.04	0.27 \pm 0.04	0.22 \pm 0.05
IND 10 mg/kg	0.10 \pm 0.05 (48.67%)	0.10 \pm 0.04* (64.51%)	0.07 \pm 0.03** (76.05%)	0.00 \pm 0.04*** (99.39%)	0.02 \pm 0.01** (90.48%)	0.02 \pm 0.04** (92.44%)

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

* $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

** $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

*** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

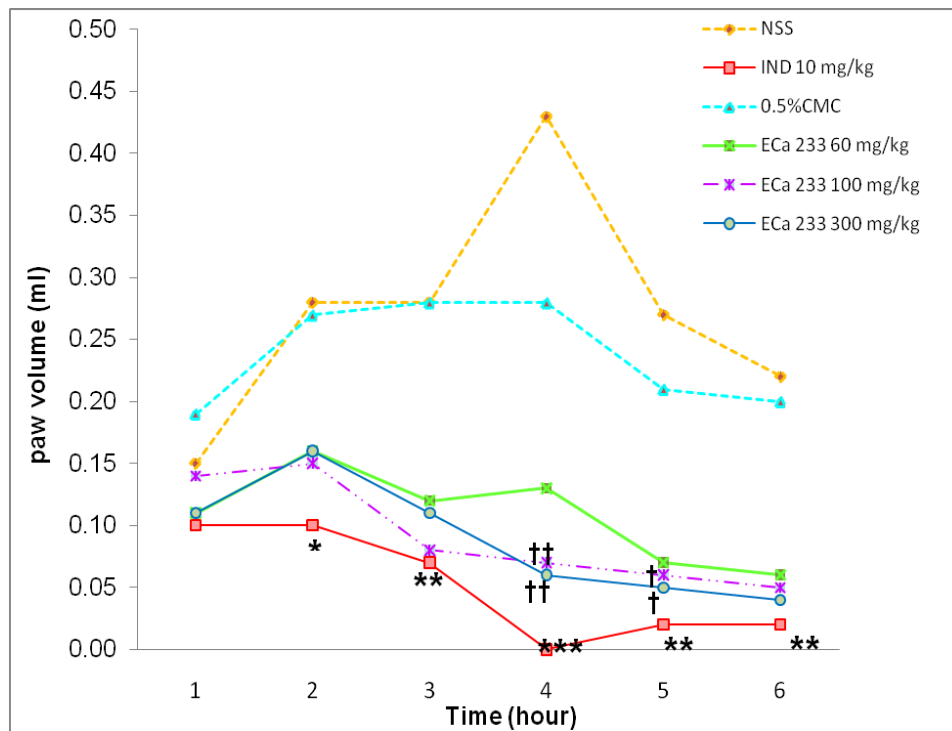
ตารางที่ 4.2 ผลของ อีซีเอ 233 ขนาด 60, 100 และ 300 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan (0.1 มล) ในหนูแรท แสดงเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับ 0.5% CMC (n=6)

treatments	paw edema \pm S.E.M.(ml)					
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr
0.5% CMC	0.19 \pm 0.05	0.27 \pm 0.05	0.28 \pm 0.03	0.28 \pm 0.04	0.21 \pm 0.04	0.20 \pm 0.05
ECa 233 60 mg/kg	0.11 \pm 0.04 (27.59%)	0.16 \pm 0.06 (43.20%)	0.12 \pm 0.04 (56.29%)	0.13 \pm 0.03 (69.80%)	0.07 \pm 0.04 (76.07%)	0.06 \pm 0.04 (72.18%)
ECa 233 100 mg/kg	0.14 \pm 0.08 (5.75%)	0.15 \pm 0.05 (46.15%)	0.08 \pm 0.08 (72.46%)	0.07 \pm 0.04** (83.53%)	0.06 \pm 0.04* (77.30%)	0.05 \pm 0.04 (79.70%)
ECa 233 300 mg/kg	0.11 \pm 0.03 (27.59%)	0.16 \pm 0.04 (43.79%)	0.11 \pm 0.04 (61.08%)	0.06 \pm 0.04** (86.67%)	0.05 \pm 0.03* (80.98%)	0.04 \pm 0.03 (81.20%)

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

* $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

** $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงปริมาณการบวมของอุ้งเท้าหนูแรท กับเวลา (1-6 ชั่วโมง) หลังการได้รับ

สารทดสอบชนิดต่างๆ ใน carrageenan-induced paw edema test (n=6)

* $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

** $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

*** $p < 0.001$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

† $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

†† $p < 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

4.2.2 Prostaglandin E₂-induced paw edema test

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ indomethacin (IND) ขนาด 10 มก./กก. สามารถลดการบวมตั้งแต่นาทีที่ 210 ไปจนถึงนาทีที่ 240 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดการบวมเท่ากับ 88.40% และ 96.45% ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.3

นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำกระสายยา (0.5 % CMC) และ หนูกลุ่มที่ได้รับ คีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับคีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. สามารถลดการบวมได้ในนาทีที่ 240 นาที ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุม โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดการบวมเท่ากับ 80.29% ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 ผลของ indomethacin (IND) ขนาด 10 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 µg/ml prostaglandin E₂ (0.1 มล) ในหนูแรท แสดงเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. (n=6)

treatments	paw edema ± S.E.M.(ml)							
	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.
NSS 10 mg/kg	0.61±0.05	0.54±0.06	0.48±0.07	0.41±0.04	0.42±0.07	0.32±0.07	0.30±0.07	0.24±0.06
IND 10 mg/kg	0.55±0.12 (8.79%)	0.46±0.06 (15.95%)	0.30±0.10 (38.62%)	0.33±0.07 (20.73%)	0.22±0.07 (73.25%)	0.16±0.08 (80.73%)	0.04±0.06* (88.40%)	0.01±0.06* (96.45%)

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

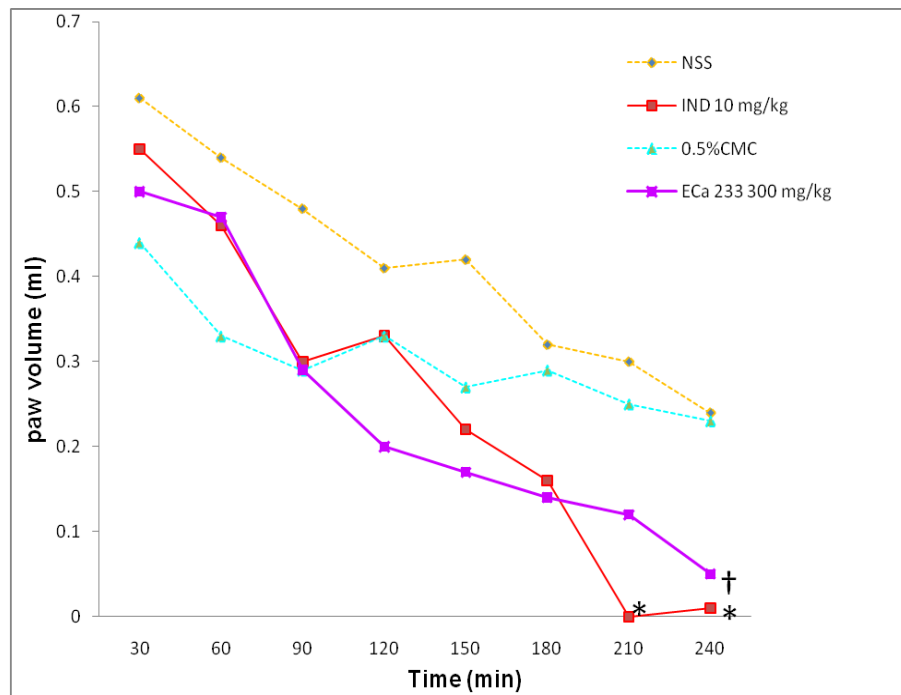
* $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

ตารางที่ 4.4 ผลของ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 µg/ml prostaglandin E₂ (0.1 มล) ในหนูแรท แสดงเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับ 0.5% CMC (n=6)

treatments	paw edema ± S.E.M.(ml)							
	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	210 min.	240 min.
0.5% CMC	0.44±0.05	0.33±0.08	0.29±0.04	0.33±0.06	0.27±0.07	0.29±0.08	0.25±0.06	0.23±0.03
Eca 233 300 mg/kg	0.50±0.07 (-12.41%)	0.47±0.10 (-42.64%)	0.29±0.11 (-12.99%)	0.20±0.11 (19.05%)	0.17±0.10 (10.81%)	0.14±0.11 (39.26%)	0.12±0.06 (50.34%)	0.05±0.07* (80.29%)

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

* $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงปริมาณการบวมของอุ้งเท้าหนูแรทกับเวลา (0-240 นาที) หลังจากได้รับ

สารทดสอบชนิดต่างๆ ใน prostaglandin E₂-induced paw edema test (n=6)

* $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ NSS

† $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.5% CMC

บทที่ 5

อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ให้โดยการป้อนทางปากแก่หนูเม้าส์ ก่อนที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ระงับปวดด้วยวิธี hot-plate วิธี tail-flick วิธี acetic acid-induced writhing และทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูแรทด้วยวิธี carrageenan-induced paw edema และ prostaglandin E₂-induced paw edema

จากการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของ อีซีเอ 233 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดด้วยแผ่นความร้อน (hot-plate test) และรังสีความร้อน (tail-flick test) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบสารที่มีฤทธิ์ระงับปวดต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Marchioro และคณะ, 2005) ที่ระดับเหนือไขสันหลัง (supraspinal) และ ไขสันหลัง (spinal) (Wong และคณะ, 2005) การทดสอบดังกล่าวนี้นิยมใช้ morphine ซึ่งเป็นยาระงับปวดมาตรฐาน ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดลอง ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่า morphine มีกลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดผ่านตัวรับ opioid ทั้งในระบบประสาทส่วนกลาง และระบบประสาทส่วนปลาย (LaMotte และคณะ, 1976)

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 60-300 มก./กก. สามารถออกฤทธิ์ระงับปวดแต่จะมีฤทธิ์อ่อนกว่ายาระงับปวดมาตรฐาน เมื่อทดสอบด้วยวิธี hot-plate นอกจากนี้ยังพบว่า ฤทธิ์ระงับปวดของอีซีเอ 233 จะถูกยับยั้งได้ด้วย naloxone ซึ่งเป็น opioid antagonist แสดงว่าการออกฤทธิ์ดังกล่าวของ อีซีเอ 233 อาจจะผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับตัวรับ opioids โดยเฉพาะที่ μ -receptor เนื่องจากเคยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าตัวรับชนิดนี้เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ระงับปวด (analgesic effect) และมีศักยภาพในการควบคุมความเจ็บปวดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยความร้อน (thermal pain) อีกด้วย (Sae-wong, 2008)

ส่วนการทดสอบด้วยวิธี acetic acid-induced writhing เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบสารที่ออกฤทธิ์ระงับปวดต่อระบบประสาทส่วนปลาย โดยเฉพาะ visceral inflammatory pain (Gene และคณะ, 1998) โดยจะเหนี่ยวนำให้เกิดความปวดด้วยสารเคมี เช่น การฉีด acetic acid เข้าช่องท้อง ทำให้เกิดการระคายเคืองและทำลายเนื้อเยื่อจนเกิดการอักเสบขึ้นและพบเซลล์อักเสบชนิด macrophages และ mast cell ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะหลั่งสารหลายชนิดออกมาบริเวณที่มีการอักเสบ เช่น histamine, serotonin, prostaglandins และ pro-inflammatory ชนิดต่างๆ ซึ่งสารเหล่านี้จะไปกระตุ้นตัวรับความรู้สึกเจ็บปวด (nociceptor) ให้ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น (Glatt และคณะ

,1977) นอกจากนั้นยังพบว่า acetic acid ทำให้เกิดการหลั่ง prostaglandins E_2 ซึ่งเกิดขึ้นใน 5 นาที หลังจากการฉีด acetic acid และพบว่า prostaglandins E_2 ทำให้ร่างกายไวต่อความเจ็บปวดโดยลดขีดกั้นความเจ็บปวด (pain threshold) ของเส้นประสาทรับความรู้สึกเจ็บปวด (Roger และคณะ, 1980) ซึ่งการทดสอบด้วยวิธีนี้จะมีความไว (sensitive) ต่อยาต้านการอักเสบมาตรฐาน (non steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) และ ยาระงับปวดชนิดเสพติด (narcotic analgesics) (Roger และคณะ, 1980) การทดสอบดังกล่าวจะใช้ indomethacin ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบมาตรฐาน ที่มีกลไกการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ในการสังเคราะห์ prostaglandins จากผลการทดลอง พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 60-300 มก./กก. สามารถออกฤทธิ์ระงับปวดแต่จะมีฤทธิ์อ่อนกว่ายาระงับปวดมาตรฐาน และฤทธิ์ระงับปวดของอีซีเอ 233 จะถูกยับยั้งได้ด้วย naloxone แสดงว่าฤทธิ์ระงับปวดของ อีซีเอ 233 อาจจะผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับตัวรับ opioids และน่าจะมีผลเกี่ยวข้องกันกับ prostaglandins มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเมื่อนำ morphine มาทดสอบด้วยวิธี acetic acid-induced writhing พบว่า morphine สามารถออกฤทธิ์ระงับปวดที่ระบบประสาทส่วนปลายได้ (peripheral nerve) และฤทธิ์ดังกล่าวถูกยับยั้งได้ด้วย naloxone (John และคณะ, 2001)

จากผลการทดลองโดยรวม อาจกล่าวได้ว่าการออกฤทธิ์ระงับปวดของอีซีเอ 233 น่าจะเป็นผลจากการออกฤทธิ์ระงับปวดต่อระบบประสาทส่วนกลางทั้งในระดับเหนือไขสันหลังและไขสันหลัง และ นอกเหนือจากนั้นแล้ว อีซีเอ 233 ยังสามารถออกฤทธิ์ระงับปวดต่อระบบประสาทส่วนปลาย โดยการออกฤทธิ์ดังกล่าวอาจจะผ่านตัวรับ opioids และยังพบว่า อีซีเอ 233 น่าจะออกฤทธิ์ระงับปวดด้วยกลไกที่อาจเกี่ยวข้องกันกับ prostaglandins (Millan, 1999) ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีนี้สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านการอักเสบของอีซีเอ 233 ในการทดสอบด้วยวิธี carrageenan-induced paw edema และ prostaglandin E_2 -induced paw edema

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้ตั้งเท้าหนูบวมด้วยคาราจีแนน (carrageenan-induced paw edema) ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งการอักเสบชนิดนี้เป็นแบบ biphasic สัมพันธ์กับการสร้าง inflammatory mediators โดยใน phase 1 จะเกี่ยวข้องกับการหลั่ง histamine, serotonin และ bradykinin ซึ่งเกิดในช่วงโมเมนต์ 1-2 ในขณะที่ phase 2 จะเกี่ยวข้องกับการหลั่ง prostaglandins เกิดในช่วงโมเมนต์ 2-6 และระดับของการบวมสูงสุดในช่วงโมเมนต์ 3 หลังการฉีด carrageenan โดยสารสื่อเหล่านี้มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดการบวมและแดง ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของการอักเสบ (Manna และ Jena, 2009)

จากผลการทดลอง พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 100-300 มก./กก. สามารถลดการบวมของอวัยวะในหนูแรทได้ทั้งชั่วโมงที่ 4 และชั่วโมงที่ 5 หลังจากฉีด carrageenan ซึ่งถือเป็นระยะที่ 2 ของการบวมซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับ prostaglandins ซึ่งสามารถเพิ่ม permeability ของหลอดเลือดทำให้เกิดการบวม ซึ่งการทดสอบดังกล่าวสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้อวัยวะบวมด้วยพรอสตาแกลนดิน อี₂ (prostaglandin E₂-induced paw edema) จากผลการทดลอง พบว่า อีซีเอ 233 ในขนาด 300 มก./กก. สามารถลดการบวมของอวัยวะในหนูหลังจากการได้รับ prostaglandin E₂ ได้ใกล้เคียงกับ indomethacin (NSAIDs) ซึ่งเป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นแสดงว่า อีซีเอ 233 น่าจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับ prostaglandins

จากผลการศึกษาทั้งหมดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 สรุปได้ว่า อีซีเอ 233 มีฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองเมื่อทดสอบด้วยวิธีต่างๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า อีซีเอ 233 ในรูปของยาป้ายปาก แสดงฤทธิ์ลดระดับความปวด ระดับการอักเสบ และขนาดของแผลร้อนในชนิดไม่รุนแรง (ชลันดากร เรื่องประเสริฐกิจ , 2553) โดยสารสำคัญที่พบใน อีซีเอ 233 เป็นสารกลุ่ม triterpenoids glycoside คือ asiaticoside และ madecassoside (Tantisira, 2008) ซึ่งเคยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า asiaticoside มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการไปยับยั้งการสร้าง nitric oxide และ pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) สารสำคัญเหล่านี้จะมีฤทธิ์คล้าย prostaglandin คือสามารถทำให้เกิดความเจ็บปวดและการอักเสบได้ (Guo และคณะ, 2000; Yun และคณะ, 2008)

อาจกล่าวโดยสรุปว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีฤทธิ์ระงับปวดโดยมีกลไกการออกฤทธิ์ทั้งในระดับระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย กลไกการระงับปวดส่วนหนึ่งน่าจะเป็นการออกฤทธิ์ผ่านตัวรับ opioid และมีความเกี่ยวข้องกับสาร prostaglandins ซึ่งนอกจากจะมีบทบาทเกี่ยวกับฤทธิ์ระงับปวดแล้ว ยังมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบของอีซีเอ 233 อีกด้วย ควรมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆที่อาจเกี่ยวข้อง และข้อมูลจากการศึกษานี้ อาจจะเป็นแนวทางในการพัฒนา อีซีเอ 233 เป็นยาสำหรับระงับปวดและต้านการอักเสบที่สามารถนำมาใช้ในมนุษย์ต่อไปได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรณิศ วรณรัตน์. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการสมานแผลใหม่ระดับที่สองในหนูแรทปกติและหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

ชลันดากร เรื่องประเสริฐกิจ. การศึกษาเบื้องต้นของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อโรคแผลร้อนในชนิดไม่รุนแรง. วารสารทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 33 (พฤษภาคม- สิงหาคม 2553) : 141-142.

ถนอมศรี วงศ์รัตนสถิตย์. เอกลักษณ์สมุนไพร. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2538.

ทอแสง วีระกุล. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ให้ทางปากต่อแผลเปิดในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.

ยุทธพร สุขวิชัย. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำของหนูเม้าส์ในภาวะปกติและภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.

หทัยชนก ทันอินทรอาจ. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการสมานแผลที่เกิดจากการกรีดในหนูแรทปกติและหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

อรัญญา มโนสร้อย, จริญญา จันทร์คำป็น และ พิธิษฐุ์ ใจนถีย์. ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดใบบัวบกในสัตว์ทดลอง. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 7 (พฤษภาคม-สิงหาคม 2552) : 116.

ภาษาอังกฤษ

- Ahmad, I., Mehmood, Z., and Mohammad, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. Journal of Ethnopharmacology 62(2)(1998): 183-193.
- Asolkar, L.V., Kakkar, K.K., and Chakre, O.J. Second Supplement to Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles: part I (A-k). In The Wealth of India, pp.189-190. New York: Raven Press, 1992.
- Babu, T.D., Kuttan, G., and Padikkala, J. Cytotoxic and anti-tumor properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. Journal of Ethnopharmacology 48(1)(1995): 53-57.
- Baenziger, N.L., Force, L.E., and Becherer, P.R. Histamine stimulates prostacyclin synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 92(4)(1980): 1435-1440.
- Barry, W.C., Mark, F.B., and Michael, A.P. Sensory and Motor systems. In Neuroscience: Exploring the Brain, pp.249-451. New York: Kluwer business, 2007.
- Benjamin, W.J. Mechanism of chronic pain. Pain Digest 6(1996): 97-108.
- Bergstrom, S., Danielsson, H., and Samuelsson, B. The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid. Biochimica et Biophysica Acta 90(1964): 207-210.
- Berry, P.H., Covington, E.C., Dahl, J.L., Katz, J.A., and Miaskowski, C. Pain: Current Understanding of Assessment, Management and Treatments. National Pharmaceutical Council: American Pain Society, 2006.

Besson, J.M., and Chaouch, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception.

Physiological Reviews 67(1)(1987): 67-186.

Bonica, J.J. International Symposium on Pain Advances in Neurology. New York: Raven Press, 1974.

Cervero, F. Pain Theories. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 72(1941): 74-79.

Cheng, C.L., and Koo, M.W. Effect of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesion in rats. Life Sciences 67(21)(2000): 2647-2653.

Chivapat, S., Chavalittumrong, P., and Tantisira, M.H. Acute and sub-chronic toxicity studies of standardized extract of *Centella asiatica* ECa233. The Thai Journal of Pharmaceutical sciences 35(2011): 55-64.

Coldren, C.D., Hashim, P., Ali, J.M., Sinsky, A.J., and Rha, C. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoid. Planta Medica 69(2008): 725-732.

Croft, P., Rigby, A.S., Boswell, R., Schollum, J., and Silman, A. The prevalence of chronic wide spread pain in the general population. Journal of Rheumatology 20(4)(1993): 710-713.

Crombie, I.K., Huw, T.O.D., and Macrae, W.A. The epidemiology of chronic pain: time for new directions. Pain 57(1)(1994): 1-3.

D'Amour, F.E., and Smith, D.L. A method for determining loss of pain sensation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 72(1)(1941): 74-79.

Daniel, L.B., Manuela, G., and Samuel, W.C. Animal model of nociception.

Pharmacological Reviews 53(4)(2001): 597-652.

Dirosa, M., Giroud, J.P., and Willoughby, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. Journal of Pathology 104(1)(1971): 15-29.

Dorp, D.A., Beerthuis, P.K., Nugteren, D.H., and Vonkeman, H. The biosynthesis of Prostaglandins. Biomedical and Life Sciences 104(1973): 204-207.

Duggan, A.W., and North, R.A. Electrophysiology of opioids. Pharmacological Reviews 35(4)(1983): 219-282.

Gene, R.M., Segura, L., Adzet, T., Daniel, L.B., Manuela, G., Samuel, W.C., et al. Heterothecaimuloides: Anti-inflammatory and analgesic. Animal model of nociception. Pharmacological Reviews 53(4)(2001): 597-652.

Glatt, M., Kalin, H., Wagner, K., and Brune, K. Prostaglandin release from macrophages: an assay system for anti-inflammatory drugs in vitro. Agents Actions 7(3)(1977): 321-326.

Guo, J.S., Cheng, C.L., and Koo, M.W. Inhibitory effects of *Centella asiatica* water extract and asiaticoside on inducible nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in rats. Planta Medica 70(12)(2000): 1150-1154.

Gupta, Y.K., Veerendra, M.H., and Srivastava, A.K. Effect of *Centella asiatica* on pentylentetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior 74(3)(2003): 579-585.

Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., and Murad, R. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutic. 7th ed. New York: Mac millan, 1985.

Hirschelman, R., and Bekemeier, H. Effect of catalase, peroxidase, superoxide dismutase and 10 scavengers of oxygen radicals in carrageenan edema and in adjuvant arthritis of rats. Cellular and Molecular Life Sciences 37(12)(1981): 1313-1314.

Hornstra, G., Haddeman, E., and Don, J.A. Some investigations into the role of prostacyclin in thromboregulation. Thrombosis Research 12(2)(1978): 367-374.

Hughes, J. Isolation of endogenous compound from the brain with properties similar to morphine. Brain Research 88(2)(1975): 295-308.

Husain, M.M., Kenneth, T., Haroon, S., and McClintock, S.M. Present and prospective clinical therapeutic regimens for Alzheimer's disease. Neuropsychiatric Disease and Treatment 4(4)(2008): 765-777.

Hussin, M., Abdul-Hamid, A., Mohamad, S., Saari, N., Ismail, M., and Bejo, MH. Protective effect of *Centella asiatica* extract and powder on oxidative stress in rats. Food Chemistry 100(2007): 535-541.

Iggo, A. The case for pain receptor. In R. Janzen (ed.), Pain: Basic Principles- Pharmacology and Therapy, pp.60-67. London: Churchill Livingstone, 1972.

Iggo, A. Peripheral and spinal pain mechanism and their modulation. In J.J. Bonica and D. Albe-Fessard (eds.), Advances in Pain Research and Therapy, pp.381-394. New York: Raven Press, 1976.

- John, A.R., Randy, S.D, Rachel, R., and Donald, A.S. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. Pain 89(2-3)(2001): 221-227.
- Kam-eg, A. Effect of the standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 on cognitive deficits induced by β -amyloid peptide (25-35) in mouse. Master's thesis, Department of Pharmacology (interdisciplinary program), Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University, 2009.
- Keele, C.A., and Armstrong, D. Substances producing pain and itch. American Physiological Society 21(5)(1964): 399-400.
- Keith, R.B., John, C.H., and Richard, M.E. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. Trends in Pharmacological Sciences 19(4)(1998): 141-147.
- Kelly, D.J., Mahmood, A., and Sorin, J.B. Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities. Canadian Journal of Anesthesia 48(10)(2001): 1000-1010.
- Koster, R., Anderson, M., and Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. Federation Proceedings 18(1959): 412.
- LaMotte, C., Pert, C.B., and Snyder, S.H. Opioid receptor binding in primate spinal cord: distribution and changes after dorsal root section. Brain Research 112(2)(1976): 407-412.
- Lundberg, A. Supraspinal control of transmission in reflex paths to motoneurons and primary afferents. In J.C. Eccles and J.P. Schade (eds.), Progress in brain Research of spinal neurons, pp.197-219. Amsterdam : Elsevier, 1964.

- Ma, J., Chenb, T., Mandelina, J., Ceponisc, A., Millerd, N.E., Hukkanena, M., and et al.
Regulation of macrophage activation. Cellular and Molecular Life Sciences
60(11)(2003): 2334–2346.
- Mahnberg, A.B., and Yaksh, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate and
substance P receptors by spinal cyclooxygenase inhibition. Science
257(5074)(1992): 1276-1279.
- Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. Progress in Neurobiology
57(1)(1999): 1-164.
- Manna, A.K., and Jena, J. Anti-inflammatory and analgesic activity of Bark extract of
Pterospermum Acerifolium. International Journal of Current Pharmaceutical
Research 1(1)(2009): 32-37.
- Maquart, F.X., Chastang, F., Simeon, A., Birembaut, P., Gillery, P., and Wegrowski, Y.
Triterpenes from Centella asiatica stimulate extracellular matrix accumulation in
rat experimental wounds. European Journal of Dermatology 9(4)(1999): 289-296.
- Marchioro, M., Blank M.F, Mourao, R.H., and Antonioli, A.R. Antinociceptive activity of
aqueous extract of Erythrina velutina leaves. Fitoterapia 76(7-8)(2005): 637-642.
- Martin, W.R. Opioid antagonist. Pharmacological Reviews 19(1967): 463-521.
- Melzack, R., and Wall, P.D. Pain mechanisms: a new theory. Science 150(3699)(1965):
971-979.

- Mokkhasmit, M., Ngarmwathana, W., Sawasdimonykol, K., and Permiphath, U.
Pharmacological evaluation of Thai medicinal plants. Journal of the Medical Association of Thailand 54(7)(1971): 490-504.
- Moncada, S., and Vane, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandins endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin . Pharmacological Reviews 30(3)(1978): 293-331.
- Nauta, W.J.H. and Kuypers, H.G.J.M. Some ascending pathway in the brainstem reticular formation. In H.H. Jasper (ed.), Reticular Formation of the Brain, pp.121-126. Ireland: Elsevier, 1958.
- Oyededeji, O.A., and Afolayan, A.J. Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and *L-ocymifolia* in the Eastern Cape, South Africa. South African Journal of Botany 71(1)(2005): 114-116.
- Panthong, A., Thammasri, K., Chiranthanut, N., Khonsung, P., Nuntasaeen, N., Jaitheerapapkul, S., et al. Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Effects of the Methanol Extract form *Bauhinia siamensis* K. & S.S. Larsen. Thai Journal of Pharmacology 31(2)(2009): 15-24.
- Raj, P.P. Pain mechanisms. In Pain medicine: A comprehensive review, pp.12-23. New York: Raven Press, 1996.
- Ramaswamy, A.S., Periasamy, S.M., and Basu, N.K. Pharmacological studies on *Centella asiatica*. Indian Journal of Medical Research 4(1970): 160.
- Ray, P.G., and Majumdar, S.K. Antimicrobial activity of some Indian plants. Economic Botany 30(4)(1976): 317-320.

- Raz, A., Isakson, P.C., Minkes, M.S., and Needleman, P. Characterisation of novel metabolic pathway of arachidonate in coronary arteries which generates a potent endogenous coronary vasodilator. Journal of Biological Chemistry 252(3)(1977): 1123-1126.
- Richardson, J.D., Aanonsen, L., and Hargreaves, K.M. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. European Journal of Pharmacology 345(2)(1998): 145-153.
- Robinson, H.J., Phares, H.F., and Graessle, O.P. Prostaglandin synthetase inhibitors and infection. In H.J. Robinson and J.R. Vane (eds.), Prostaglandin synthetase inhibitors, pp.327-342. New York: Raven Press, 1974.
- Roger, D., Simone, J., Fran, O.E., and Michline, F. Release of prostaglandins e and f in an algogenic reaction and its inhibition. European Journal of Pharmacology 61(1)(1980): 17-24
- Sae-wong, C., Ridditid, W., Reanmongkol, W., and Wongnawa, M. Antinociceptive Activity of the Methanolic Extract of Kaempferia galangal and Its Possible mechanism in Experimental animal. Thai Journal of Pharmacology 30(2)(2008): 26-35.
- Sakina, M.R., and Dandiya, P.C. A psycho-neuropharmacological profile of *Centella asiatica* extract. Fitoterapia 61(4)(1990): 291-296.
- Shukla, A., Rasik, A.M., Jain, G.K., Shankar, R., Kulshrestha, D.K., and Dhawan, B.N. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. Journal of Ethnopharmacology 65(1)(1999): 1-11.

Somchit, M.N., Sulaiman, M.R., Zuraini, A., Samsuddin, L., and Somchit, N.

Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Centella asiatica*. Indian Journal of Pharmacology 36(6)(2004): 377-380.

Stanton-Hick, H., Janig, W., Hassenbusch, S., Haddock, J.D., Boas, R., and Wilson, P.

Reflex sympathetic dystrophy: changing concept & taxonomy. Pain 63(1)(1995): 127-133.

Sunilkumar, P.S., and Shivakumar, H.G. Evaluation of topical formulations of aqueous

extract of *Centella asiatica* on open wounds in rats. Indian Journal of Experimental Biology 36(6)(1998): 569-572.

Tantisira, M.H. Bioactive Standardized Extract of *Centella asiatica* (ECa 233).

Proceeding of the Eighth NRCT-JSPS Joint Seminar: Innovative Research in Natural Products for Sustainable Development. Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University, 2008.

Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like

drugs. Nature new biology 231(1971): 231-238.

Vane, J.R. Prostaglandins as mediators of inflammation. In Samuelsson and R. Paoletti

(eds.), Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, pp.791-801.

New York: Raven Press, 1976.

Weinstein, S.H., Pfeffer, M., Schor, J.M. Franklin, L., Mints, M., and Tutko, E.R. Absorption

and distribution of naloxone in rats after oral and intravenous administration.

Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 62(1973): 1416-1419.

- Willer, J.C., BeBrouckert, T., and Bussel, B. Central analysis effect of ketoprofen in humans: eketrophysiologic evidence for a supraspinal mechanism in a double-blind and cross-over study. Pain 38(1)(1989): 1-8.
- Winter, C.A., Risley, E.A., and Nuss, C.W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 111(1962): 544-547.
- Wolfe, J.A., Plotzker, R., Safina, F.J., Ross, M., Popky, G., and Rubin, W. Gastritis, duodenitis and bleeding duodenal ulcer following mefanamic acid therapy. Archives of Internal Medicine 136(8)(1976): 923-925.
- Wong, C.H., Dey, P., Yarmush, J., Wu, W.H., and Zbuzek, V.K. Nifedipine-induced analgesia after epidural injections in rats. Anaesthesia and Analgesia 79(2)(1994): 303-306.
- Woolfe, G., and MacDonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 80(3)(1944): 300.
- Wu, K.M., Martin, W.R., Kamerling, S.G., and Wetl-stein, J.G. Possible medullary kappa hyperalgesia mechanism. A new potential role for endogenous opioid peptides in pain perception. Life Sciences 33(18)(1983): 1831-1838.
- Yun, K.J., Kim, J.Y., Kim, J.B., Lee, K.W., Jeong, S.Y., Park, H.J., et al. Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF- κ B in activation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. International Immunopharmacology 8(2008): 431-441.

Zola, E.M., and McLeod, D.C. Comparative effects and analgesic efficacy of the agonist-antagonist opioids. International Journal of Clinical Pharmacology and therapeutics 17(6)(1983): 412-417.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลของ Mouse Hot-plate test

ตารางที่ 1 แสดงเวลาที่หนูเม้าส์สามารถทนความร้อน (latency) ที่เวลา 0-240 นาที ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ อีซีไอ ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน (n=10)

treatments mg/kg	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	240 min
0.5% CMC	15.47±1.22	16.86±1.57	15.81±0.97	15.73±1.06	16.74±1.47	16.21±1.00	17.26±1.33
ECa 233 10	16.57±1.52	16.70±2.20	16.96±1.70	19.01±1.87	18.79±1.47	18.82±2.13	16.94±1.90
ECa 233 30	21.34±2.32	19.91±2.60	16.91±1.28	17.22±1.54	14.99±2.32	14.22±1.18	19.44±1.99
ECa 233 60	26.94±3.44	27.26±2.97	25.17±3.02	26.07±3.74	30.26±3.42	26.01±31.51	31.51±3.35
ECa 233 100	22.19±3.15	23.33±3.15	25.20±3.66	21.19±3.06	22.66±2.78	29.08±3.55	23.82±3.27
ECa 233 300	34.46±3.06	28.05±2.88	29.97±3.10	32.36±2.68	31.90±2.88	35.32±2.88	33.28±2.75

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 2 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเม้าส์ ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ ซีซีไอ 233 ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน (n=10)

treatments mg/kg	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	240 min	area of analgesia (%MPE-min)
0.5% CMC	-9.72±4.91	-4.07±5.36	-8.84±5.34	-9.18±5.43	-4.45±4.60	-6.59±3.13	-2.55±4.14	-1326.27±557.23
ECa 233 10	-5.65±5.29	-4.02±6.50	-3.87±5.26	4.93±4.28	3.14±3.95	3.23±6.63	4.90±8.18	-49.59±818.96
ECa 233 30	18.68±10.30	13.54±11.29	6.02±4.92	6.91±6.21	-0.96±8.68	-3.06±4.97	14.30±7.42	1329.46±1217.31
ECa 233 60	34.09±13.13	35.14±11.22	27.76±11.43	33.83±12.33	50.01±11.26	31.91±7.21	52.02±11.07	9230.93±1754.80
ECa 233 100	25.55±6.94	29.28±8.72	36.86±11.38	22.01±9.18	25.48±7.73	47.46±10.69	32.08±8.46	8119.34±1633.83
ECa 233 300	64.28±9.94	37.12±9.92	43.04±9.41	54.58±7.26	54.85±7.83	67.13±8.50	58.50±9.13	13585.30±1116.72

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ภาคผนวก ข

ข้อมูลของการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัด
มาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ด้วยวิธี Mouse Hot-plate test

ตารางที่ 3 แสดงเวลาที่หนูเมาส์สามารถทนความร้อน (latency) ที่เวลา 0-240 นาที ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 09% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. และ naloxone (NAL) ขนาด 5 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน และได้รับ naloxone ขนาด 5 มก./กก. ร่วมกับ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. (n=10)

treatments (mg/kg)	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	240 min
NSS	24.03±1.81	24.23±1.78	23.47±1.92	24.46±2.26	22.95±2.05	23.87±2.06	23.39±1.67
0.5% CMC	20.50±1.57	19.56±1.96	20.69±2.04	19.76±1.83	19.69±1.72	20.92±1.79	21.20±1.75
NAL 5	19.55±2.23	19.71±1.12	19.72±2.05	18.33±2.04	18.56±2.09	19.58±1.69	19.30±1.94
ECa 233 300	21.45±1.52	23.90±1.50	24.05±1.15	24.19±2.04	23.63±1.14	23.80±1.32	23.64±1.63
NAL+ECa 233 300	20.25±2.02	18.63±1.62	18.87±1.77	20.67±2.35	19.59±2.02	20.73±1.64	21.17±2.12

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 4 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเม้าส์ ใน Hot-plate test หลังจากได้รับ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. และ naloxone (NAL) ขนาด 5 มก./กก. โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ได้รับ 0.5% CMC และ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อน และได้รับ Naloxone ขนาด 5 มก./กก. ร่วมกับ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. (n=10)

treatments (mg/kg)	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	240 min	area of analgesia (%MPE-min)
NSS	10.54±3.54	9.67±6.10	8.75±3.66	14.80±4.31	-10.27±1.90	11.25±2.94	7.20±3.53	1734.52±402.31
0.5% CMC	4.87±2.51	1.06±5.49	6.22±4.87	1.46±5.37	1.89±6.72	6.72±3.06	7.91±3.05	1250.61±497.94
NAL 5	5.88±5.59	1.72±4.70	5.31±3.79	0.12±3.29	1.31±4.16	3.74±2.03	3.31±3.13	714.47±523.25
ECa 233 300	14.92±5.80	24.29±5.06	24.60±3.91	25.95±6.26	22.44±5.35	23.59±4.94	22.80±6.36	5351.53±796.43
NAL +ECa 233 300	9.62±3.09	1.03±3.28	2.96±2.76	12.87±5.34	5.23±4.75	8.36±4.95	13.25±3.22	2072.81±474.88

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ภาคผนวก ค
ข้อมูลของ Mouse Tail-flick test

ตารางที่ 5 แสดงเวลาที่หนูเม้าส์สามารถทนความร้อน (latency) ที่เวลา 0-240 นาที ใน Tail-flick test หลังจากได้รับน้ำ 0.5% CMC และ อีซีไอ ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน (n=10)

treatments mg/kg	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	240 min
0.5% CMC	1.57±0.09	1.52±0.06	1.49±0.06	1.58±0.13	1.41±0.06	1.53±0.10	1.50±0.08
ECa 233 10	1.67±0.09	1.64±0.10	1.63±0.11	1.76±0.11	1.75±0.08	1.72±0.14	1.64±0.10
ECa 233 30	1.59±0.07	1.66±0.08	1.65±0.07	1.74±0.06	1.58±0.04	1.68±0.04	1.66±0.07
ECa 233 60	1.82±0.10	1.75±0.09	1.70±0.10	1.73±0.10	1.89±0.05	1.89±0.08	1.63±0.05
ECa 233 100	1.72±0.15	1.54±0.10	1.64±0.11	1.96±0.13	2.03±0.21	2.11±0.12	1.58±0.14
ECa 233 300	1.93±0.12	2.31±0.32	2.27±0.28	1.94±0.11	1.94±0.11	1.89±0.13	2.05±0.19

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 6 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area of analgesia) ระหว่าง %MPE กับเวลา ที่เวลา 0-240 นาที ของหนูเม้าส์ ใน Tail-flick test หลังจากได้รับ 0.5% CMC และ คีซีไอ ขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อน (n=10)

treatments mg/kg	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	240 min	area of analgesia (%MPE-min)
0.5% CMC	3.80±3.71	1.68±3.04	0.26±3.70	4.41±5.06	-2.59±2.62	1.87±4.68	0.91±3.40	302.45±584.66
ECa 233 10	2.23±4.94	1.02±5.55	0.70±5.78	7.04±4.47	5.57±4.92	5.21±5.63	0.92±5.64	831.16±763.55
ECa 233 30	1.26±2.73	3.89±4.01	3.62±3.39	7.18±3.27	0.82±1.87	4.83±2.33	3.73±4.22	903.72±573.09
ECa 233 60	11.20±4.23	8.00±4.72	5.87±5.28	7.24±5.01	13.71±3.48	13.96±3.57	3.36±2.78	2199.45±589.65
ECa 233 100	12.47±5.91	5.55±4.09	9.48±4.44	22.14±4.52	24.38±7.79	27.61±4.20	7.24±5.44	4147.36±840.83
ECa 233 300	20.80±5.34	35.30±12.58	33.79±11.28	21.37±4.48	19.28±5.98	25.01±8.07	34.19±13.06	6334.49±1650.82

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ภาคผนวก ง
ข้อมูลของ Acetic acid-induced writhing

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing response ของหนูเม้าส์ ทุกๆ 5 นาที ตลอด 30 นาที หลังจากได้รับสารทดสอบชนิดต่างๆ (n=6)

treatments mg/kg	time course (นาที)						total (30 นาที)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
NSS	1.50±0.22	3.83±0.31	5.50±0.85	4.00±0.45	2.83±0.48	2.00±0.37	20.67±1.02
IND 10	0.17±0.17	0.17±0.17	0.83±0.54	1.00±0.52	0.33±0.21	0.00±0.00	2.5±1.31
0.5%CMC	0.67±0.21	3.50±0.43	6.00±0.82	3.50±0.67	2.33±0.56	2.33±0.67	18.33±1.71
ECa 233 10	0.50±0.34	2.17±0.87	3.17±1.01	3.50±0.92	2.83±0.87	2.67±1.09	14.83±3.70
ECa 233 30	0.67±0.33	2.00±0.68	4.00±0.68	2.83±0.54	1.00±0.37	1.83±0.70	12.33±1.93
ECa 233 60	0.17±0.17	1.33±0.49	1.50±0.56	0.67±0.42	0.50±0.22	0.00±0.00	4.17±1.40
ECa 233 100	0.17±0.17	0.50±0.34	1.00±0.68	0.83±0.83	0.50±0.34	0.00±0.00	3.00±1.90
ECa 233 300	0.00±0.00	0.50±0.34	1.50±0.50	0.33±0.21	0.33±0.21	0.17±0.17	2.83±1.01

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ภาคผนวก จ

ข้อมูลของการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัด
มาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ด้วยวิธี Acetic acid-induced writhing

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิด writhing response ของหนูเมาส์ ทุกๆ 5 นาที ตลอด 30 นาที หลังจากได้รับสารทดสอบชนิดต่างๆ (n=6)

treatments mg/kg	time course (นาที)						total (30 นาที)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
0.5%CMC	0.50±0.22	4.50±0.43	4.50±0.67	4.50±0.76	2.33±0.42	2.67±1.14	19.00±1.51
ECa 233 300	0.00±0.00	0.50±0.34	1.50±0.50	0.33±0.21	0.33±0.21	0.17±0.17	2.83±1.01
NAL+ECa 233	0.17±0.17	2.67±0.33	3.50±0.67	2.50±0.56	2.33±0.88	2.00±0.58	13.17±1.14

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ภาคผนวก จ

ข้อมูลของ Carrageena induced-paw edema

ตารางที่ 9 ผลของ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before carrageenan injection		1.2	1.21	1.35	1.34	1.3	1.32		
1 hr	paw volume (ml)	1.42	1.37	1.45	1.54	1.37	1.44		-
	volume of edema (ml)	0.22	0.16	0.1	0.2	0.07	0.12	0.15	
2 hr	paw volume (ml)	1.49	1.39	1.47	1.61	1.76	1.69		-
	volume of edema (ml)	0.29	0.18	0.12	0.27	0.46	0.37	0.28	
3 hr	paw volume (ml)	1.58	1.51	1.49	1.58	1.59	1.64		-
	volume of edema (ml)	0.38	0.3	0.14	0.24	0.29	0.32	0.28	
4 hr	paw volume (ml)	1.68	1.61	1.72	1.62	1.87	1.77		-
	volume of edema (ml)	0.48	0.4	0.37	0.28	0.57	0.45	0.43	
5 hr	paw volume (ml)	1.48	1.44	1.52	1.54	1.77	1.6		-
	volume of edema (ml)	0.28	0.23	0.17	0.2	0.47	0.28	0.27	
6 hr	paw volume (ml)	1.46	1.53	1.42	1.43	1.61	1.6		-
	volume of edema (ml)	0.26	0.32	0.07	0.09	0.31	0.28	0.22	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 10 ผลของ indomethacin ขนาด 10 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
	paw volume before carrageenan injection	1.3	1.48	1.36	1.43	1.34	1.32		
1 hr	paw volume (ml)	1.39	1.49	1.58	1.35	1.5	1.5		33.33
	paw volume of edema (ml)	0.09	0.01	0.22	-0.08	0.16	0.18	0.10	
2 hr	paw volume (ml)	1.44	1.54	1.45	1.36	1.57	1.44		66.27
	volume of edema (ml)	0.14	0.06	0.09	-0.07	0.23	0.12	0.10	
3 hr	Paw volume (ml)	1.35	1.64	1.45	1.38	1.45	1.36		76.05
	volume of edema (ml)	0.05	0.16	0.09	-0.05	0.11	0.04	0.07	
4 hr	paw volume (ml)	1.37	1.31	1.45	1.37	1.41	1.33		99.61
	volume of edema (ml)	0.07	-0.17	0.09	-0.06	0.07	0.01	0.00	
5 hr	paw volume (ml)	1.34	1.48	1.4	1.43	1.38	1.32		92.64
	volume of edema (ml)	0.04	0	0.04	0	0.04	0	0.02	
6 hr	paw volume (ml)	1.44	1.51	1.43	1.34	1.26	1.34		93.23
	volume of edema (ml)	0.14	0.03	0.07	-0.09	-0.08	0.02	0.02	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 11 ผลของ 0.5% CMC ขนาด10 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before carrageenan injection		1.2	1.21	1.35	1.34	1.3	1.32		
1 hr	paw volume (ml)	1.52	1.38	1.4	1.44	1.47	1.64		-
	volume of edema (ml)	0.32	0.17	0.05	0.1	0.17	0.32	0.19	
2 hr	paw volume (ml)	1.39	1.39	1.47	1.61	1.76	1.69		-
	volume of edema (ml)	0.19	0.18	0.12	0.27	0.46	0.37	0.27	
3 hr	paw volume (ml)	1.58	1.51	1.49	1.58	1.59	1.64		-
	volume of edema (ml)	0.38	0.3	0.14	0.24	0.29	0.32	0.28	
4 hr	paw volume (ml)	1.48	1.41	1.52	1.62	1.57	1.77		-
	volume of edema (ml)	0.28	0.2	0.17	0.28	0.27	0.45	0.28	
5 hr	paw volume (ml)	1.48	1.38	1.41	1.54	1.57	1.6		-
	volume of edema (ml)	0.28	0.17	0.06	0.2	0.27	0.28	0.21	
6 hr	paw volume (ml)	1.46	1.53	1.42	1.53	1.31	1.66		-
	volume of edema (ml)	0.26	0.32	0.07	0.19	0.01	0.34	0.20	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 12 ผลของ อีซีเอ 233 ขนาด 60 มก./กก.ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนียวน้ำด้วย 1% carrageenan (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before carrageenan injection		1.47	1.36	1.54	1.28	1.39	1.35		
1 hr	paw volume (ml)	1.42	1.43	1.57	1.51	1.59	1.5		27.59
	volume of edema (ml)	-0.05	0.07	0.03	0.23	0.2	0.15	0.11	
2 hr	paw volume (ml)	1.62	1.65	1.57	1.36	1.4	1.75		43.2
	volume of edema (ml)	0.15	0.29	0.03	0.08	0.01	0.4	0.16	
3 hr	paw volume (ml)	1.65	1.62	1.56	1.34	1.42	1.53		56.29
	volume of edema (ml)	0.18	0.26	0.02	0.06	0.03	0.18	0.12	
4 hr	paw volume (ml)	1.64	1.49	1.67	1.27	1.59	1.5		69.8
	volume of edema (ml)	0.17	0.13	0.13	-0.01	0.2	0.15	0.13	
5 hr	paw volume (ml)	1.51	1.56	1.49	1.24	1.57	1.41		76.07
	volume of edema (ml)	0.04	0.2	-0.05	-0.04	0.18	0.06	0.07	
6 hr	paw volume (ml)	1.51	1.48	1.51	1.2	1.59	1.47		72.18
	volume of edema (ml)	0.04	0.12	-0.03	-0.08	0.2	0.12	0.06	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 13 ผลของ อีซีเอ 233 ขนาด 100 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before carrageenan injection		1.36	1.49	1.53	1.25	1.31	1.29		
1 hr	paw volume (ml)	1.69	1.46	1.36	1.53	1.51	1.5		5.75
	volume of edema (ml)	0.33	-0.03	-0.17	0.28	0.2	0.21	0.14	
2 hr	paw volume (ml)	1.59	1.44	1.6	1.43	1.56	1.52		46.15
	volume of edema (ml)	0.23	-0.05	0.07	0.18	0.25	0.23	0.15	
3 hr	paw volume (ml)	1.49	1.31	1.65	1.46	1.61	1.17		47.46
	volume of edema (ml)	0.13	-0.18	0.12	0.21	0.3	-0.12	0.08	
4 hr	paw volume (ml)	1.53	1.42	1.57	1.47	1.37	1.29		72.46
	volume of edema (ml)	0.17	-0.07	0.04	0.22	0.06	0	0.07	
5 hr	paw volume (ml)	1.45	1.44	1.6	1.45	1.41	1.25		77.3
	volume of edema (ml)	0.09	-0.05	0.07	0.2	0.1	-0.04	0.06	
6 hr	paw volume (ml)	1.43	1.36	1.57	1.42	1.44	1.28		79.7
	volume of edema (ml)	0.07	-0.13	0.04	0.17	0.13	-0.01	0.05	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 14 ผลของ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก.ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1% carrageenan (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before carrageenan injection		1.48	1.36	1.34	1.37	1.3	1.28		
1 hr	paw volume (ml)	1.53	1.42	1.45	1.42	1.45	1.49		27.59
	volume of edema (ml)	0.05	0.06	0.11	0.05	0.15	0.21	0.11	
2 hr	paw volume (ml)	1.51	1.55	1.46	1.57	1.41	1.58		43.79
	volume of edema (ml)	0.03	0.19	0.12	0.2	0.11	0.3	0.16	
3 hr	paw volume (ml)	1.49	1.54	1.51	1.43	1.32	1.49		61.08
	volume of edema (ml)	0.01	0.18	0.17	0.06	0.02	0.21	0.11	
4 hr	paw volume (ml)	1.52	1.46	1.56	1.31	1.3	1.32		86.67**
	volume of edema (ml)	0.04	0.1	0.22	-0.06	0	0.04	0.06	
5 hr	paw volume (ml)	1.5	1.46	1.52	1.35	1.31	1.3		80.98*
	volume of edema (ml)	0.02	0.1	0.18	-0.02	0.01	0.02	0.05	
6 hr	paw volume (ml)	1.54	1.4	1.53	1.33	1.3	1.28		81.2
	volume of edema (ml)	0.06	0.04	0.19	-0.04	0	0	0.04	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ภาคผนวก ข

ข้อมูลของ Prostaglandin E₂-induced paw edema

ตารางที่ 15 ผลของ 0.9% normal saline solution (NSS) ขนาด 10 มล./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 µg/ml prostaglandin E₂ (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before prostaglandin E ₂ injection		1.42	1.51	1.52	1.2	1.29	1.33		
30 min.	paw volume (ml)	1.91	2.17	1.83	2.06	1.81	1.71		-
	volume of edema (ml)	0.47	0.68	0.52	0.81	0.58	0.58	0.61	
60 min.	paw volume (ml)	1.96	2.13	1.65	1.91	1.62	1.84		-
	volume of edema (ml)	0.52	0.64	0.34	0.66	0.39	0.71	0.54	
90 min.	paw volume (ml)	1.99	1.75	2.09	1.76	1.61	1.55		-
	volume of edema (ml)	0.55	0.26	0.78	0.51	0.38	0.42	0.48	
120 min.	paw volume (ml)	1.68	1.87	1.85	1.7	1.6	1.61		-
	volume of edema (ml)	0.24	0.38	0.54	0.45	0.37	0.48	0.41	
150 min.	paw volume (ml)	1.64	1.94	1.54	1.71	1.85	1.69		-
	volume of edema (ml)	0.2	0.45	0.23	0.46	0.62	0.56	0.42	
180 min.	paw volume (ml)	1.62	1.71	1.44	1.86	1.61	1.53		-
	volume of edema (ml)	0.18	0.22	0.13	0.61	0.38	0.4	0.32	
210 min.	paw volume (ml)	1.54	1.7	1.43	1.7	1.69	1.6		-
	volume of edema (ml)	0.1	0.21	0.12	0.45	0.46	0.47	0.30	
240 min.	paw volume (ml)	1.53	1.76	1.41	1.5	1.71	1.35		-
	volume of edema (ml)	0.09	0.27	0.1	0.25	0.48	0.22	0.24	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 16 ผลของ indomethacin ขนาด 10 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 µg/ml prostaglandin E₂ (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before prostaglandin E ₂ injection		1.42	1.51	1.52	1.2	1.29	1.33		
30 min.	paw volume (ml)	1.81	1.86	1.72	2.2	2	2		8.79
	volume of edema (ml)	0.39	0.35	0.2	1	0.71	0.67	0.55	
60 min.	paw volume (ml)	1.71	1.85	1.85	1.71	1.91	1.98		15.95
	volume of edema (ml)	0.29	0.34	0.33	0.51	0.62	0.65	0.46	
90 min.	paw volume (ml)	1.65	1.83	1.52	1.32	1.93	1.8		38.62
	volume of edema (ml)	0.23	0.32	0	0.12	0.64	0.47	0.30	
120 min.	paw volume (ml)	1.62	1.84	1.66	1.66	1.55	1.89		20.73
	volume of edema (ml)	0.2	0.33	0.14	0.46	0.26	0.56	0.33	
150 min.	paw volume (ml)	1.55	1.73	1.44	1.6	1.53	1.73		48.02
	volume of edema (ml)	0.13	0.22	-0.08	0.4	0.24	0.4	0.22	
180 min.	paw volume (ml)	1.59	1.77	1.32	1.54	1.38	1.64		49.48
	volume of edema (ml)	0.17	0.26	-0.2	0.34	0.09	0.31	0.16	
210 min.	paw volume (ml)	1.51	1.37	1.39	1.31	1.36	1.54		88.4*
	volume of edema (ml)	0.09	-0.14	-0.13	0.11	0.07	0.21	0.04	
240 min.	paw volume (ml)	1.51	1.31	1.35	1.32	1.33	1.5		96.45*
	volume of edema (ml)	0.09	-0.2	-0.17	0.12	0.04	0.17	0.01	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 17 ผลของ 0.5% CMC ขนาด 10 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 µg/ml prostaglandin E₂ (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before prostaglandin E ₂ injection		1.53	1.42	1.36	1.41	1.24	1.41		
30 min.	paw volume (ml)	1.91	1.75	1.83	1.94	1.89	1.71		-
	volume of edema (ml)	0.38	0.33	0.47	0.53	0.65	0.3	0.44	
60 min.	paw volume (ml)	1.63	1.58	1.74	1.81	1.91	1.67		-
	volume of edema (ml)	0.1	0.16	0.38	0.4	0.67	0.26	0.33	
90 min.	paw volume (ml)	1.82	1.52	1.63	1.8	1.6	1.74		-
	volume of edema (ml)	0.29	0.1	0.27	0.39	0.36	0.33	0.29	
120 min.	paw volume (ml)	1.82	1.66	1.62	1.67	1.88	1.69		-
	volume of edema (ml)	0.29	0.24	0.26	0.26	0.64	0.28	0.33	
150 min.	paw volume (ml)	1.73	1.52	1.56	1.62	1.83	1.72		-
	volume of edema (ml)	0.2	0.1	0.2	0.21	0.59	0.31	0.27	
180 min.	paw volume (ml)	1.67	1.62	1.51	1.68	1.89	1.75		-
	volume of edema (ml)	0.14	0.2	0.15	0.27	0.65	0.34	0.29	
210 min.	paw volume (ml)	1.61	1.54	1.55	1.68	1.72	1.74		-
	volume of edema (ml)	0.08	0.12	0.19	0.27	0.48	0.33	0.25	
240 min.	paw volume (ml)	1.69	1.57	1.64	1.64	1.56	1.64		-
	volume of edema (ml)	0.16	0.15	0.28	0.23	0.32	0.23	0.23	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 18 ผลของ อีซีเอ 233 ขนาด 300 มก./กก. ที่เวลาต่างๆ ต่อการบวมของอุ้งเท้าซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 µg/ml prostaglandin E₂ (0.1 มล) ในหนูแรท (n=6)

		NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	average	%inhibition
paw volume before prostaglandin E ₂ injection		1.29	1.34	1.32	1.37	1.32	1.16		
30 min.	paw volume (ml)	1.91	1.69	1.65	1.77	1.81	1.96		-12.41
	volume of edema (ml)	0.62	0.35	0.33	0.4	0.49	0.8	0.50	
60 min.	paw volume (ml)	2.11	1.52	1.62	1.72	1.85	1.79		-42.64
	volume of edema (ml)	0.82	0.18	0.3	0.35	0.53	0.63	0.47	
90 min.	paw volume (ml)	1.94	1.42	1.55	1.62	1.69	1.62		-17.24
	volume of edema (ml)	0.65	0.08	0.23	0.25	0.37	0.46	0.34	
120 min.	paw volume (ml)	1.61	1.44	1.36	1.75	1.68	1.45		24.37
	volume of edema (ml)	0.32	0.1	0.04	0.38	0.36	0.29	0.25	
150 min.	paw volume (ml)	1.63	1.35	1.44	1.45	1.59	1.63		19.88
	volume of edema (ml)	0.34	0.01	0.12	0.08	0.27	0.47	0.22	
180 min.	paw volume (ml)	1.42	1.37	1.46	1.46	1.64	1.57		36.00
	volume of edema (ml)	0.13	0.03	0.14	0.09	0.32	0.41	0.19	
210 min.	paw volume (ml)	1.33	1.38	1.4	1.35	1.53	1.54		50.34
	volume of edema (ml)	0.04	0.04	0.08	-0.02	0.21	0.38	0.12	
240 min.	paw volume (ml)	1.21	1.32	1.21	1.33	1.5	1.5		80.29*
	volume of edema (ml)	-0.08	-0.02	-0.11	-0.04	0.18	0.34	0.05	

ข้อมูลข้างต้นรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย



Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

Certificate of Project Approval		<input type="checkbox"/> Original	<input type="checkbox"/> Renew
Animal Use Protocol No. 12-33-002		Approval No. 12-33-002	
Protocol Title Antinociceptive and anti-inflammatory effects of standardized extract of <i>Centella asiatica</i> ECa233 in animal models			
Principal Investigator Pasarapa Towiwat, Ph.D.			
Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.			
Date of Approval January 30, 2012		Date of Expiration January 30, 2015	
Applicant Faculty/Institution Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Rd., Pathumwan BKK-THAILAND. 10330			
Signature of Chairperson 		Signature of Authorized Official 	
Name and Title THONGCHAI SOOKSAWATE, Ph.D. Chairman		Name and Title PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D. Associate Dean (Research and Academic Service)	
<p><i>The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals.</i></p> <p><i>This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.</i></p>			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ : นางสาวปฐวีณ์กร เกษโกมล

เกิด : วันที่ 20 พฤศจิกายน พ.ศ.2529

ภูมิลำเนา : บ้านเลขที่ 118 หมู่ 14 ตำบลโพธิ์ทอง อำเภอโพธิ์ทอง จังหวัดร้อยเอ็ด

สำเร็จการศึกษา : ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีว - การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต เมื่อปีการศึกษา 2552 และศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา (สหสาขา) บัณฑิตวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

นำเสนอผลงาน : เรื่อง Anti-nociceptive Effects of Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 in Tail flick Test ในวารสารเภสัชวิทยา (*Thai Journal of Pharmacology*, Vol 34)

ร่วมงานประชุมวิชาการประจำปี สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34 ระหว่างวันที่ 22-24 มีนาคม พ.ศ. 2555 ณ ห้องประชุมสี สิริสิงห อาคารสมเด็จย่า 93 คณะทันตแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย