บทที่ 3

อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย

Materials and Methods

3.1 สมุนไพรและแหล่งที่มา

พรอโพลิสจากบริษัทไทยลานนา ซึ่งเก็บจากรังผึ้งที่เลี้ยงในสวนลำไยที่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ มีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีดำ มีกลิ่นเฉพาะ เก็บรักษาไว้ที่เย็น เพื่อนำไปสกัดด้วยเอทานอล

3.2 สัตว์ทดลอง เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้น้ำหนักประมาณ 100-150 กรัม จากสำนักศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม เมื่อได้หนูแล้วนำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพหนูก่อนทำการทดลองที่ศูนย์เลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อยเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25 $\pm$ 1°C มีแสงสว่างพอเหมาะโดยได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมง และเลี้ยงในกรงที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด โดยให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ (CP 082 mice feed) และ น้ำสะอาดอย่างเพียงพอตามความต้องการของสัตว์ทดลอง

3.2.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

aluminum foils (Diamond, USA), autoclave tape (3M, USA), autoclave (Hirayama, Japan), autopipette (Gilson, France), beakers: 50 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA), biohazard lamina-flow hood (Science, Gelman), centrifuge, cylinders (Pyrex, USA), disposable gloves (Latex, USA), eppendorf (Corning, USA), ELISA microplate reader (Multiskan EX, Germany), evaporator, freezer – 80° C (Sanyo, Japan), glass pipettes: 1 ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany), hemocytometer (Boeco, Germany), hot air oven, incubator, light microscope (Olympus, Japan), microscope glass cover slips (Chance, England), 96 and 24 multi-well plates (Nunc, Denmark), parafilm (American National Can, USA), pH meter SA 520 (Orian, USA), pipette (Falcon, USA), pipette tip: 1000, 200, 20 µl (Molecular Bio- products, USA), plastic tube (Becton Dickinson), plethysmometer, reagent bottles: 50,100,250,500 and 1000 ml (Duran, Germany), scrapper, sterile membrane filters (Whatman, Japan), sterile polypropylene centrifuge tube: 15 ml, 50 ml. (Nunc, Denmark), sterile millipore 0.22 µM, 0.45 µM (Millex-GP, USA), refrigerator 4°C, - 20°C (Sanyo, Japan), T- 25 and T-75 Tissue Culture flasks (Nunc, Denmark), vacuum pump, vortex mixer (Labnet, USA)

Plethysmometer, (UGO BASILE 7140) เป็นเครื่องมือสำหรับวัดปริมาตรการบวมที่บริเวณอุ้งเท้าของหนูขาว หลักการทำงานของเครื่องจะใช้หลักการแทนที่น้ำซึ่งจะมีหลอดแก้วรูปทรงกระบอกขนาดสูง 6 เซนติเมตร จำนวน 2 หลอด โดยทั้งสองหลอดมีช่องเล็กๆ เป็นทางเชื่อมติดต่อกันได้เมื่อใส่สารละลาย electrolyte ลงไป เมื่อทำการจุ่มอุ้งเท้าของหนูขาวลงไปที่หลอดแก้วด้านหนึ่งจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำเกิดขึ้น และจะวัดการเปลี่ยนแปลงด้วย volume transducer ค่าที่อ่านได้เป็นตัวเลขมีหน่วยเป็นมิลลิลิตร (ml) ดังแสดงในภาพที่ 13

3.2.3 สารเคมี

absolute ethanol (Merck, Germany), calcium cholide (Merck, Germany), carrageenan, dexamethasone, dimethyl sulfloxide (DMSO) (Sigma, USA), doxorubicin, dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Sigma, USA), fetal bovine serum (Hyclone, USA), glucose (Merck, Germany), , HEPES (Hyclone,USA), hydrochloric acid: (Merck, Germany), Indomethacin, L-glutamine (Gibco, Germany), lipopolysaccharide (Sigma, USA), MTT (Sigma, USA), penicillin/streptomycin (Hyclone, USA), potassium chloride (Merck, Germany), potassium hydrogen phosphate (Merck, Germany), potassium hydroxide (Merck, Germany), sodium chloride (Sigma, USA), sodium hydroxide (Merck, Germany), di-sodium hydrogen phosphate monobasic (Merck, Germany), sodium bicarbonate (Baker, USA), sodium hypochloride (Clorox, USA), 0.4 % Trypan blue dye (Sigma, USA)

nitric oxide assay kit (Promega, USA), Mouse TNF-α ELISA test kit (Hycult biotechnology)

3.3 Cell line

Mouse monocyte / macrophage cell line: RAW 264.7 (ATCC Number TIB-71)

เลี้ยงเซลล์ใน 25-cm^2 cultured flasks ด้วยอาหาร complete DMEM ที่ 37 °C, 97% humidity, 5%CO_2

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 วิธีการสกัดพรอโพลิสไทย

การสกัดนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วแช่ใน ethanol 95% ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 คืน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแยกกากทิ้งไป นำสิ่งสกัดที่ได้ไประเหยสารละลาย ethanol ด้วยเครื่อง vacuum evaporator จะได้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่มีลักษณะเป็นสารหนืดสีดำ การเก็บรักษาจะเก็บสิ่งสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 °c

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดสอบ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 : *in vivo* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งอาการบวมจากการฉีดสารกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ indomethacin

ขั้นตอนที่ 2 : *in vitro* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide และการหลั่ง cytokine TNF-α รวมทั้งศึกษา ความเป็นพิษของสมุนไพรโดยใช้การทำ MTT assay

ขั้นตอนที่ 1 : *in vivo* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งอาการบวมจากการฉีดสารกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ indomethacin

3.4.2 การเตรียมยา, สารต่างๆ และสมุนไพร

3.4.2.1 การเตรียม 1% carrageenan ใน 0.9% sodium chloride solution

ชั่ง carrageenan 0.1 กรัมแล้วนำมาใส่ในสารละลาย 0.9% sodium chloride solution (normal saline) ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ขวดปิดฝาให้มิด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้พองตัวเต็มที่

3.4.2.2 การเตรียมสารละลาย electrolyte

ชั่ง sodium chloride 1.0 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น และเติมสารลดแรงตึงผิว (detergent) 5 ml เก็บใส่ขวดไว้ใช้เป็นสารละลายที่ใช้สำหรับการวัดปริมาตรของเท้าหนู

3.4.2.3 การเตรียมยา indomethacin

ยา indomethacin parenteral injection โดยฉีดเข้าช่องท้องหนูในขนาด 5 mg/kg เตรียม indomethacin ที่เป็น standard solution ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยทำการ pipette ยามา 0.8 ml และปรับปริมาตรด้วย normal saline ให้ได้เป็น 2 ml

3.4.2.4 การเตรียมพรอโพลิสไทยสำหรับทดลองวัด paw edema

ทำการเตรียมสารละลายพรอโพลิสไทยความเข้มข้น 200 mg/ml, 300 mg/ml และ 400 mg/ml ตามลำดับ โดยทำการชั่งพรอโพลิส แล้วละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

3.4.3 วิธีการทดลองวัดการบวมของอุ้งเท้าหนู

ทำให้อุ้งเท้าหนูบวมโดยการฉีดสาร carrageenan เข้าที่อุ้งเท้าของหนูขาว (carrageenan induced - foot edema test) ซึ่งเป็นการศึกษาการอักเสบชนิดเฉียบพลัน (acute inflammation) ตามวิธีของ Winter [41] ดังนี้

1. เตรียมหนูที่จะทำการทดลอง โดยงดอาหารหนูแต่สามารถให้น้ำได้เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ก่อนการทดลองเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารไปรบกวน bioavailability ของยา
2. แบ่งเป็นกลุ่มการทดลอง 5 กลุ่ม ใช้หนูกลุ่มการทดลองละ 8 ตัว[42] คือ

กลุ่มที่ 1 : negative control โดยให้ DMSO ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip)

กลุ่มที่ 2 : positive control โดยให้ยาต้านการอักเสบ indomethacin ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip) ขนาด 5 mg/kg

กลุ่มที่ 3 : ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (EEP) ที่ขนาด 200 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip)

กลุ่มที่ 4 : ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (EEP) ที่ขนาด 300 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip)

กลุ่มที่ 5 : ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (EEP) ที่ขนาด 400 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip)

3. ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวเพื่อใช้ในการคำนวณขนาดของยา
4. ขีดเส้นรอบข้อเท้าหนูบริเวณ กระดูก lateral malleolus เพื่อเป็นแนวที่จะใช้วัดปริมาตรของอุ้งเท้า
5. วัดปริมาตรของอุ้งเท้าหนูก่อนทำการฉีดสาร carrageenan ด้วยเครื่อง plethysmometer
6. ฉีดสารละลาย 1% carrageenan ใน 0.9% sodium chloride solution ปริมาตร 0.1 ml เข้าที่ใต้อุ้งเท้า (subplantar injection) หลังจากให้สารทดลองแล้ว 1 ชั่วโมง
7. ทำการวัดปริมาตรอุ้งเท้าหลังจากฉีด carrageenan แล้ว 1 ชั่วโมงและทำการวัดซ้ำอีกทุกๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วบันทึกผล
8. ระหว่างการทดลองให้งดอาหารและน้ำหนูด้วย เพื่อป้องกันการรบกวนจากอาหารและน้ำต่อการบวมที่จะเกิดขึ้น

I22961641

3.4.4 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอาการบวม

ก่อนการกระตุ้นให้อุ้งเท้าหนูเกิดการอักเสบจะวัดปริมาตรอุ้งเท้าข้างที่จะฉีดสารก่อน โดยทำเครื่องหมายขีดเส้นรอบข้อเท้าหนูบริเวณ กระดูก lateral malleolus เป็นแนวที่จะใช้วัดปริมาตรของอุ้งเท้า เพื่อเป็นปริมาตรของอุ้งเท้าหนูก่อนฉีด carrageenan เท่ากับ V_p เมื่อให้ยาแต่ละกลุ่มแล้ว 1 ชั่วโมง จึงฉีดสารกระตุ้นให้อุ้งเท้าหนูเกิดการบวมด้วย 1% carrageenan ใน 9% sodium chloride 0.1 ml เข้าที่ใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณอุ้งเท้าด้านหลังของหนู หลังฉีด carrageenan แล้วทำการวัดอุ้งเท้าหนูทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยการวัดกลุ่มที่ได้รับสารละลายยา indomethacin และ EEP วัดปริมาตรเท่ากับ V_d และกลุ่มที่ได้รับ DMSO วัดปริมาตรเท่ากับ V_c

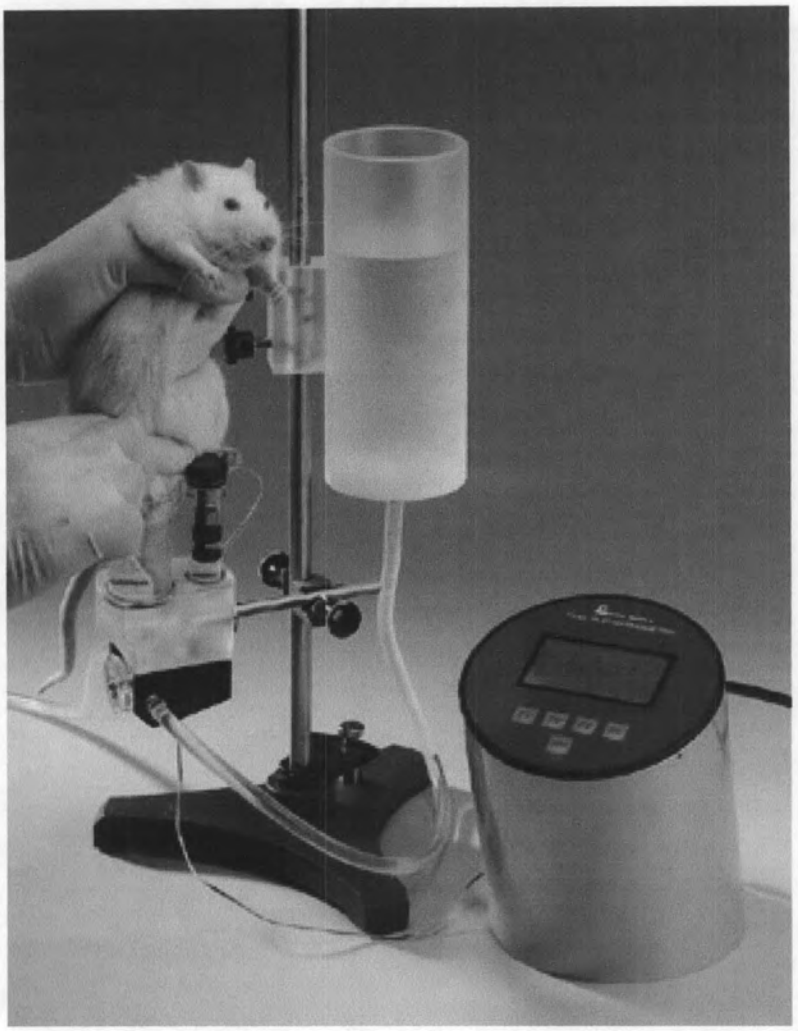
ปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าหนู (volume of edema) เท่ากับ ปริมาตรอุ้งเท้าโดยวัดหลังฉีด carrageenan ลบด้วยปริมาตรอุ้งเท้าก่อนฉีด carrageenan

ดังนั้น ปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าหนูในกลุ่มควบคุม (DMSO) = $V_c - V_p$

ปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าหนูในกลุ่มที่ได้รับยา (indomethacin และ EEP) = $V_d - V_p$

$$\%\text{Inhibition} = \left(\frac{(V_c - V_p) - (V_d - V_p)}{V_c - V_p} \right) \times 100$$

$$\%\text{Inhibition} = \left(1 - \frac{V_d - V_p}{V_c - V_p} \right) \times 100$$



ภาพที่ 13 แสดงเครื่องมือ plethysmometer ที่ใช้ในการทดลองฤทธิ์การยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย 1% carrageenan

ขั้นตอนที่ 2 : *in vitro* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide และการหลั่ง cytokine TNF-α รวมทั้งศึกษา ความเป็นพิษของสมุนไพร โดยใช้การทำ MTT assay

3.4.5 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยง macrophage cell line RAW 264.7

เซลล์ mouse macrophage cell line (RAW 264.7) จะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) ที่เพิ่ม supplement 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 25 mM HEPES, $NaHCO_3$, 100 U/ml penicillin และ 100 µg/ml streptomycin

3.4.6 การเลี้ยง macrophage cell line (RAW264.7) การตรวจสอบ cell viability และการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS

macrophage cell line (RAW264.7) เลี้ยงในอาหารเลี้ยง DMEM (ที่เตรียมจากข้อ 3.4.5) แล้วเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ 5% CO_2 และทำการแบ่งเซลล์ที่โตเต็มแล้วพร้อมกับเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 3 วัน หรือเมื่อเซลล์เต็ม flask ถึง 70% ของพื้นที่ของ flask ที่เลี้ยง

การตรวจสอบ cell viability ทำโดยการใช้สีย้อมเซลล์ trypan blue และทำการนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่สามารถติดสีน้ำเงิน โดยต้องมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตไม่ต่ำกว่า 90% จึงจะสามารถนำมาทำการทดลองได้

การกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS โดยการแบ่งเซลล์มาจำนวน $1x10^5$ cells/ml ใส่ใน 24-well plate โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่มการทดลองคือ

กลุ่มที่ 1 : negative control : เป็นสารละลายที่ใช้ในการละลายพรอโพลิสไทย (vehicle : 0.05 % DMSO)

กลุ่มที่ 2 : กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (100 ng/ml) เพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ 3 : pretreated เซลล์ด้วยพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ (10-100 µg/ml)หรือด้วยยา dexamethasone 10 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (EEP+LPS) [43]

เก็บ supernatant นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ NO และ TNF - α ตามวิธีการในข้อ 3.4.8 และ 3.4.9 ตามลำดับ

3.4.7 การทดสอบความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (MTT assay)

ทดสอบกับสมุนไพรที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, และ 100 μg/ml และทดสอบกับ dexamethasone 10 μM ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง วิธีการทำ assay

1. นำเซลล์ RAW 264.7 ความเข้มข้น $1x10^5$cells/ml ที่อยู่ใน completed DMEM ปริมาตร 90 μl ใส่ลงใน 96-well plate

2. Incubate cells ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C, 97% humidity, 5%CO_2

3. เติมสารที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษ 10 μl ลงใน well โดยมีกลุ่มควบคุมคือ กลุ่มที่ให้น้ำกลั่น และกลุ่มที่ให้ยาต้านมะเร็ง doxorubicin

4. Incubate cells ไว้ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C, 97% humidity, 5%CO_2.

5. เติม MTT solution (5 mg/ml ละลายใน PBS) 10 μl ลงในแต่ละ well

6. Incubate cells เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C, 97% humidity, 5%CO_2.

7. เท supernatant ทิ้งไป แล้วเติม concentrate DMSO 100 μl ลงในแต่ละ well เพื่อละลาย formazan crystal.

8. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดและสังเกตว่าผลึกของ formazan ละลายหมดจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm และ 650 nm โดยเครื่อง microplate reader

9. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดที่ความยาวคลื่นทั้ง 2 ความยาวคลื่นมาลบกันได้เป็นค่า delta absorbance (delta OD) แล้วนำไปคำนวณหาเป็น %viability เมื่อเทียบกับน้ำกลั่น

$$\%\text{viability} = \left(\frac{\text{delta OD (sample)}}{\text{delta OD (control)}} \right) \times 100$$

delta OD (sample) = delta absorbance ของสารที่ทดสอบความเป็นพิษคือ สมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ, ยา dexamethasone, ยา doxorubicin

delta OD (control) = delta absorbance ของน้ำกลั่น

3.4.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide (Determination of nitric oxide concentration)

1. นำส่วน supernatant จากข้อ 3.4.6 ปริมาตร 100 µl ในแต่ละ well มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent 20 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ในที่มืด (ทำตามวิธีที่แนบมาพร้อมกับ kit Promega Griess Reagent)

2. นำ plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ 550 nm

3. เปรียบเทียบปริมาณ nitric oxide ที่วัดได้จากตัวอย่างกับ standard sodium nitrite ที่ได้จากการทำ standard curve โดยค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น µm ของ nitrite

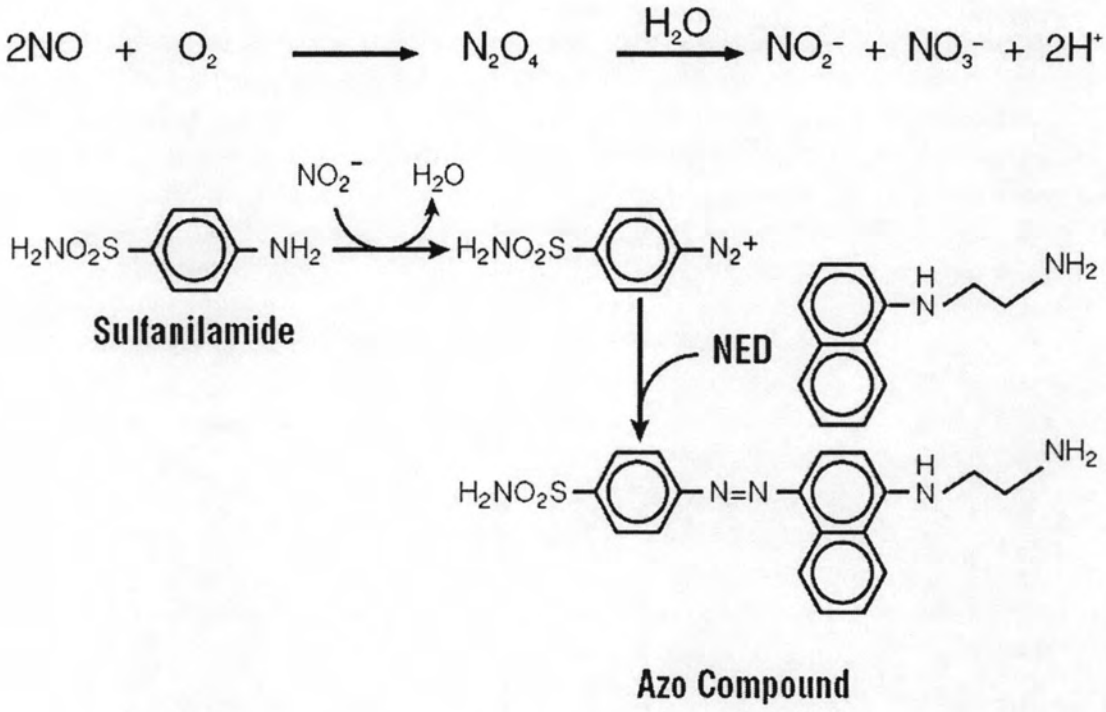
การคำนวณ %inhibition ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และยา dexamethasone เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ LPS 100 ng/ml คำนวณโดยใช้สูตร

$$\%\text{inhibition} = \left(\frac{NO^-_2\,(\text{control}) - NO^-_2\,(\text{sample})}{NO^-_2\,(\text{control})} \right) \times 100$$

NO^-_2 (control) = ปริมาณ NO^-_2 ที่วัดได้จากกลุ่มที่ให้เพียง LPS 100 ng/ml(positive control)

NO^-_2 (sample) = ปริมาณ NO^-_2 ที่วัดได้จากกลุ่มที่ให้สมุนไพรหรือ dexamethasone ร่วมกับ LPS 100 ng/ml

*หมายเหตุ Griess reaction เป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้น โดยในการวัดปริมาณของ NO ที่หลั่งออกมาโดยจะวัดในรูปของ nitrite (NO^-_2) เนื่องจาก NO เมื่อหลั่งออกมาจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้เป็น dinitrogen tetraoxide และเมื่อทำปฏิกิริยาต่อกับน้ำจะได้ผลิตภัณฑ์คือ nitrate (NO^-_3) และ nitrite (NO^-_2) ดังที่แสดงในภาพที่ 14 และในการทดลองเพื่อวัดปริมาณ NO จะวัดในรูปของ nitrite (NO^-_2) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับ Griess reagent ได้เป็น azo compound ที่มีสีทำให้สามารถวัดปริมาณของ nitrite (NO^-_2) ที่มีอยู่ได้ โดยใช้ เครื่องวัด spectrophotometer ที่สามารถวัดการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm



ภาพที่ 14 แสดงสมการปฏิกิริยาของ NO ในการสลายตัวได้เป็น nitrate (NO^-_3) และ nitrite (NO^-_2) และปฏิกิริยาในการวัดปริมาณของ nitrite โดยใช้ Griess reaction

NED = N-1-napthylethylenediamine dihydrochloride

3.4.9 การวิเคราะห์หาปริมาณ tumor necrosis factor – α (Determination of TNF – α concentration)

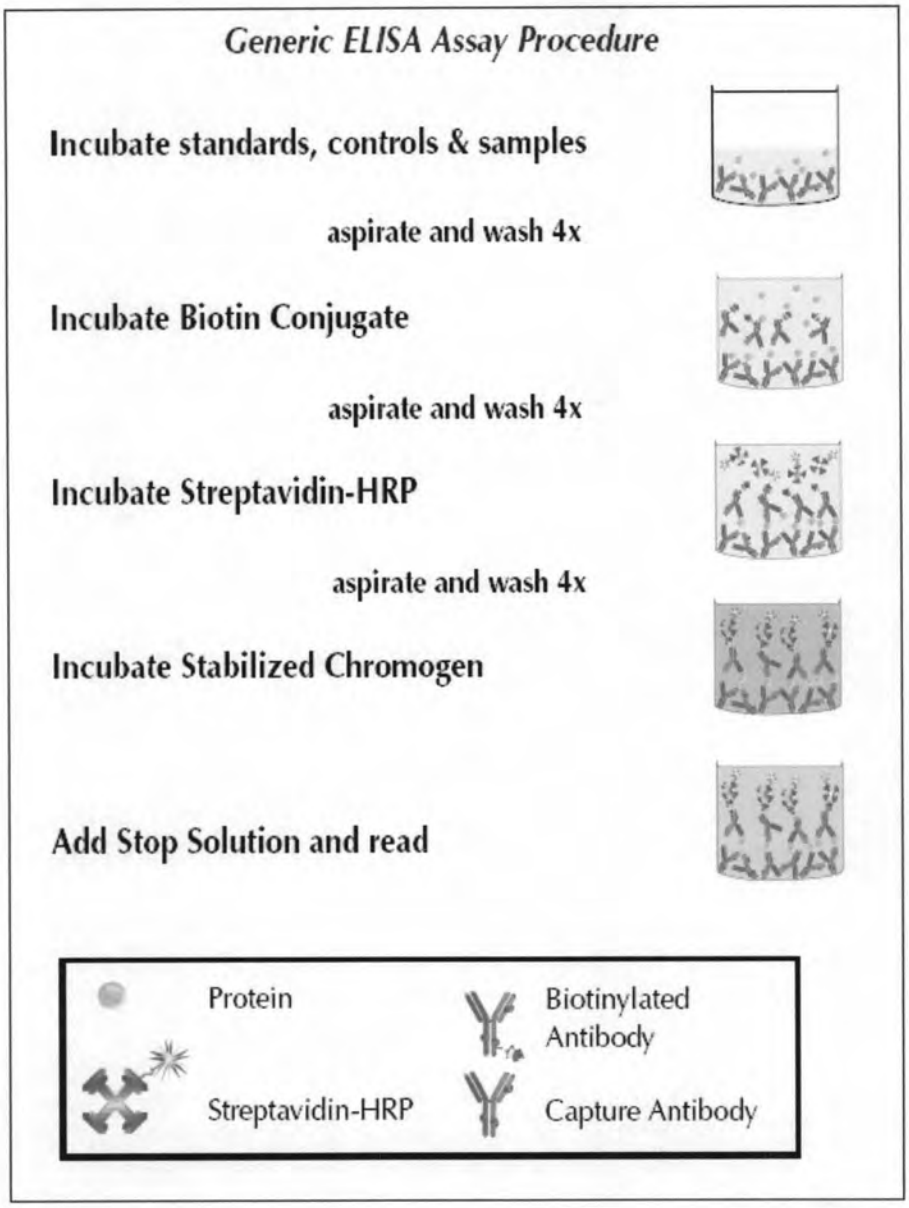
นำส่วน supernatant จากข้อ 3.4.6 มา 100 µl ทำการวัดปริมาณ TNF - α โดยใช้วิธี sandwich ELISA (ทำตามวิธีที่แนบมาพร้อมกับ kit Hycult biotechnology ดังแสดงในรูปที่ 15) และนำไปอ่านผลโดยวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยใช้เครื่อง automated microplate reader และเปรียบเทียบปริมาณ TNF - α ที่วัดได้จากตัวอย่างกับ standard recombinant mouse TNF – α ที่ได้จากการทำ standard curve โดยค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น pg/ml

การคำนวณ %inhibition ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และยา dexamethasone เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ LPS 100 ng/ml คำนวณโดยใช้สูตร

$$\%\text{inhibition} = \left(\frac{\text{TNF - α (control)} - \text{TNF - α (sample)}}{\text{TNF - α (control)}} \right) \times 100$$

TNF - α (control) = ปริมาณ TNF - α ที่วัดได้จากกลุ่มที่ให้เพียง LPS 100 ng/ml

TNF - α (sample) = ปริมาณ TNF - α ที่วัดได้จากกลุ่มที่ให้สมุนไพรหรือ dexamethasone ร่วมกับ LPS 100 ng/ml



ภาพที่ 15 แสดงวิธีการวัดหาปริมาณ TNF – α โดยวิธีการ sandwich ELISA

3.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

1. ขั้นตอนที่ 1 คำนวณ ค่าที่ได้เป็น %inhibition ในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสมุนไพรหรือกลุ่มที่ให้ยา indomethacin กับกลุ่มควบคุม (negative control)

ขั้นตอนที่ 2 นำปริมาณของ nitric oxide, TNF - α ที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสมุนไพรหรือกลุ่มที่ให้ยา dexamethasone กับกลุ่มควบคุม (negative control)

2. การวิเคราะห์ข้อมูล; ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.)

3. เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มโดยใช้ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)