

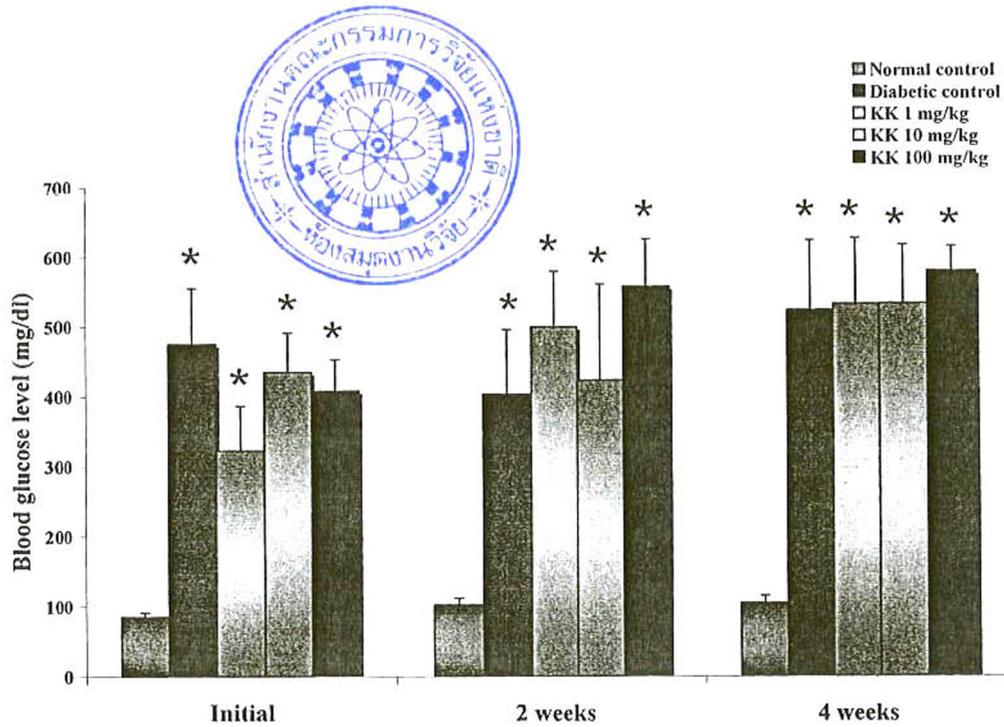
## วิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองนี้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และใช้ Duncann test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติและค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$

## ผลการทดลอง

### 1. ค่าระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของหนูที่เหนียวนำไปเป็นเบาหวาน

การเหนียวนำหนูให้เป็นเบาหวานโดยการฉีดสาร streptozotocin ที่ความเข้มข้น 55 mg/kg BW เพียงครั้งเดียว โดยการฉีดสารเข้าทางหลอดเลือด (intravenous injection) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ทำการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด โดยนำหนูมาทำการเก็บเลือดโดยการตัดหางหนูด้านปลายออกเล็กน้อย แล้วจึงนำเลือดที่ได้มาวัดหาระดับน้ำตาล โดยใช้ glucose test kit (Accu-check advantage II glucose test kit, Roche diagnostic Ltd., Switzerland) โดยเริ่มเจาะเลือดหนูเมื่อเริ่มต้นการฉีด streptozotocin และเมื่อเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ พบว่าหนูหลังจากที่ได้รับ การฉีดด้วย streptozotocin แล้วจะพบว่าหนูทุกตัวจะมีระดับของน้ำตาลในเลือดสูงทุก ๆ กลุ่ม รวมทั้งหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง ซึ่งหนูทุกกลุ่มจะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงตั้งแต่ 300 mg/dl ขึ้นไปจะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

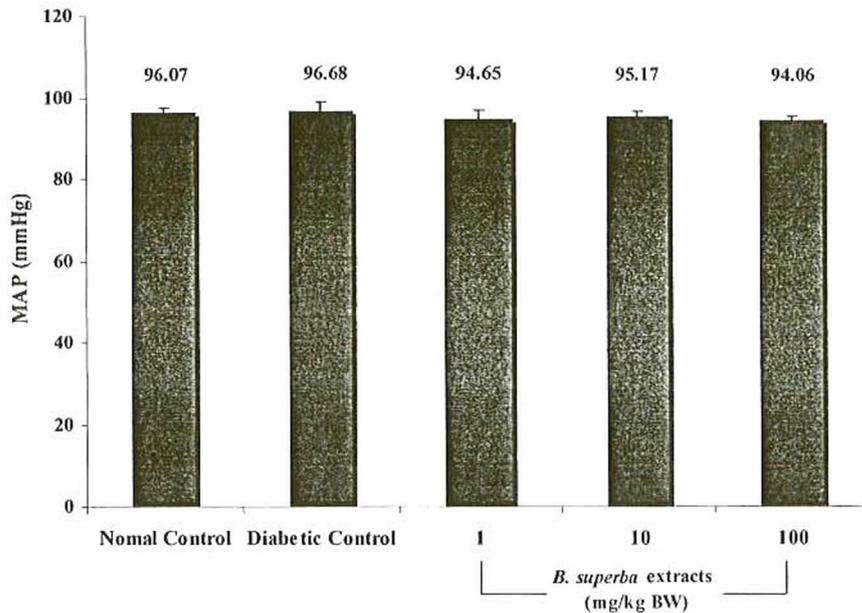


รูปที่ 1 แสดงค่าระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ หลังจากถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวาน โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean)  $\pm$  SD, \*P < 0.05 แสดงข้อมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, KK = สารสกัดกวาวเครือแดง

## 2. ผลของสารสกัดกวาวเครือแดงต่อค่า mean arterial blood pressure (MAP) ในหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

เมื่อให้สารสกัดกวาวเครือแดงแก่หนูติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำหนูทุกกลุ่มมาวัด MAP พบว่าหนูทุกกลุ่มมีค่า MAP ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม นั้นแสดงว่าสภาวะเบาหวานไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า (MAP)

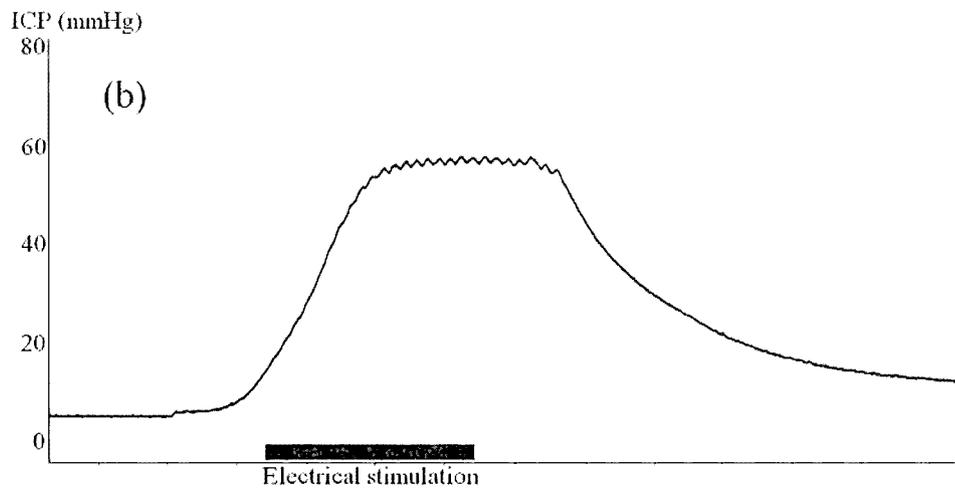
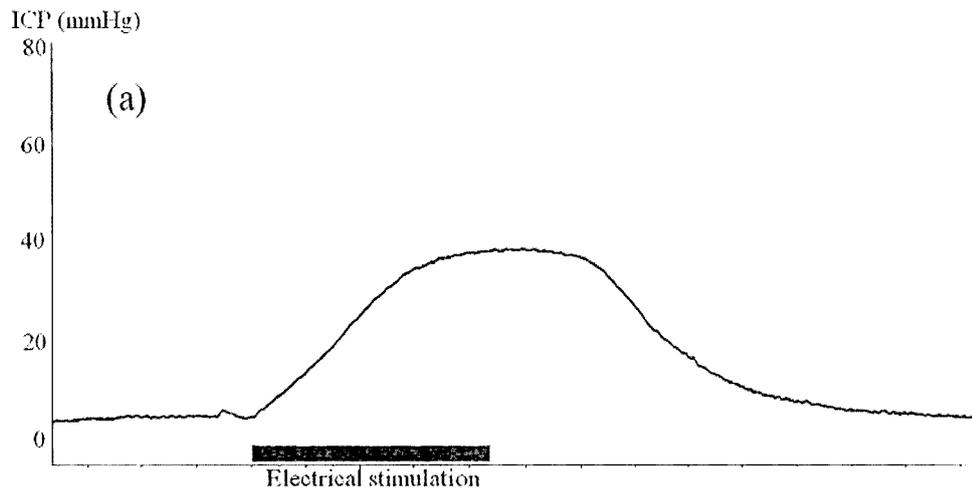
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
 ห้องสมุดงานวิจัย  
 วันที่... 01 ... ค.ศ. 2555  
 เลขทะเบียน.....  
 เลขเรียกหนังสือ.....



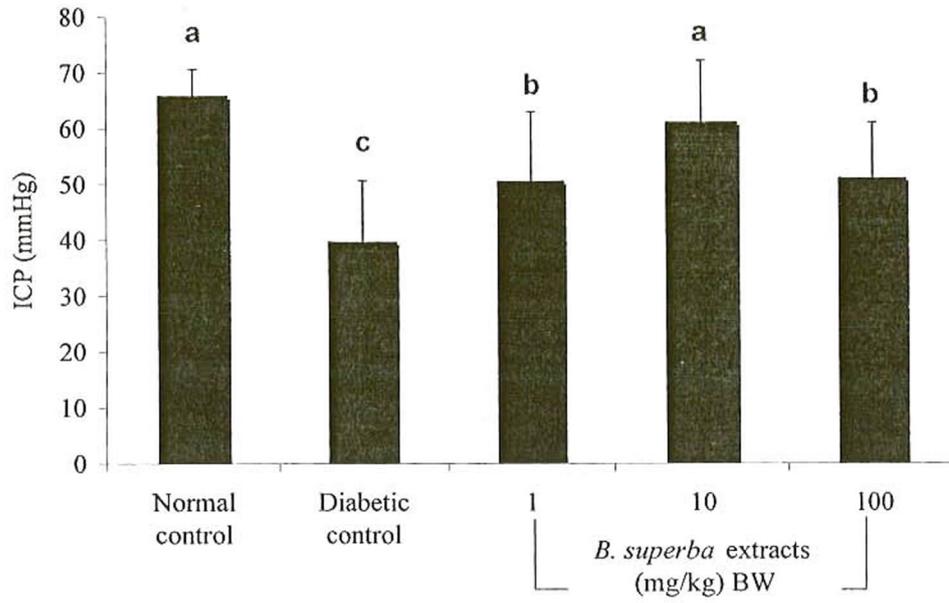
รูปที่ 2 แสดงผลของสารสกัดกวาวเครือแดงต่อการเปลี่ยนแปลงค่า MAP ในหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean)  $\pm$  SD, \*P < 0.05 แสดงข้อมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

### 3. การเปลี่ยนแปลงของค่า ICP ของหนูที่เป็นเบาหวานและหนูที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือแดงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เมื่อให้สารกวาวเครือแดงแก่หนูติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำหนูทุกกลุ่มมาวัด ICP พบว่าหนูในกลุ่มควบคุมเบาหวานที่ได้รับน้ำกลั่น มีค่า ICP ต่ำกว่าหนูควบคุมปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อนำหนูที่เป็นเบาหวานมาป้อนด้วยสารสกัดกวาวเครือแดง ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มก ต่อ นนตัว พบว่าค่า ICP สูงขึ้นกว่าหนูควบคุมเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 10 มก ต่อ นนตัว ให้ค่า ICP สูงที่สุด (รูปที่ 3 และ 4)



**รูปที่ 3** รูปแสดงการเปลี่ยนแปลงค่า ICP (a) หนูเบาหวานควบคุม (b) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 10 mg/kg BW เป็นเวลา 4 สัปดาห์

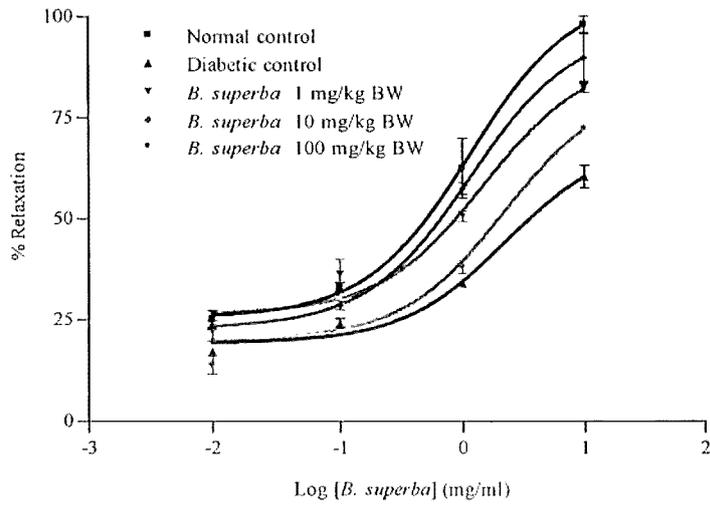


รูปที่ 4 แสดงผลของสารสกัดกวาวเครือแดงต่อการเปลี่ยนแปลงค่า ICP โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± SD, <sup>a,b,c</sup> P < 0.05 แสดงข้อมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

#### 4. ผลของสารสกัดกวางเครือแดงต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อแกนองคชาตหนูเบาหวาน

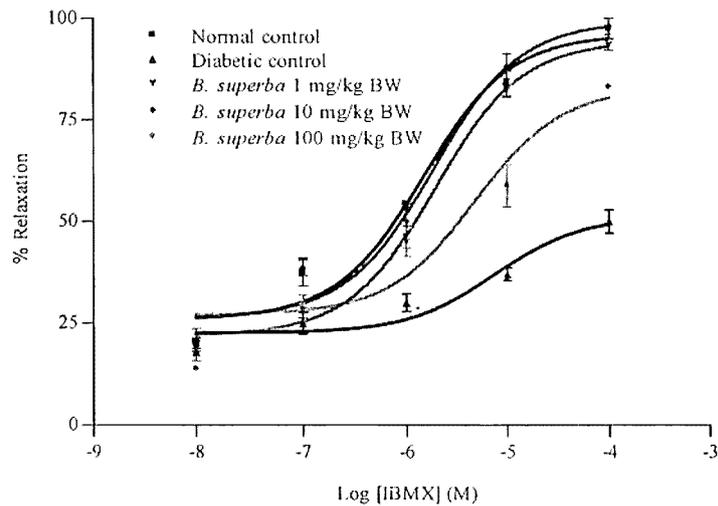
เมื่อให้สารสกัดกวางเครือแดงแก่หนูติดต่อกันเป็น เวลา 4 สัปดาห์ ทำการผ่าแยกเอาเฉพาะเนื้อเยื่อส่วน corpus cavernosum แล้วจึงรับนำเนื้อเยื่อใส่ไว้ในบัฟเฟอร์ HPSS ที่ประกอบด้วย 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, 11 mM glucose, pH 7.4 และมี 100%  $\text{O}_2$  จากนั้นทำการแขวนชิ้นของเนื้อเยื่อที่ติดกับ probe ที่ติดกับ force transducer ที่ต่อกับเข้ากับ เครื่องคอมพิวเตอร์ MacLab สำหรับการอ่านค่าความแรงการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ โดยเริ่มด้วยการหยดสาร phenylephrine เข้าไปเพื่อให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว จากนั้นทำการล้างกล้ามเนื้อด้วยบัฟเฟอร์แล้วจึงหยดสารสกัดกวางเครือแดงที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ลงไปเพื่อทดสอบดูการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบในแกนองคชาต พบว่า เนื้อเยื่อส่วน corpus cavernosum ในหนูกลุ่มเบาหวานควบคุมมีฤทธิ์ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมปกติ หรือหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง และพบว่ากล้ามเนื้อเรียบแกนองคชาตสามารถคลายตัวได้ดีที่สุดเมื่อได้รับสารสกัดกวางเครือแดงที่ความเข้มข้น 10 มก ต่อ นนตัว โดยมีค่า  $\text{EC}_{50}$  1.17 (รูปที่ 5)

จากนั้นทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อ กับสาร isobutyl-methylxanthine (IBMX) ซึ่งเป็น phosphodiesterase inhibitor เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าในหนูกลุ่มที่เป็นเบาหวานและได้รับสารสกัดกวางเครือแดง เมื่อทำการหยด IBMX จะมีการคลายตัวของกล้ามเนื้อดีกว่าหนูเบาหวานควบคุม ค่า  $\text{EC}_{50}$  ของหนูกลุ่มควบคุมปกติ หนูกลุ่มควบคุมเบาหวาน และหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดงความเข้มข้น 1, 10 และ 100 10 มก ต่อ นนตัว มีค่าเท่ากับ  $1.48 \times 10^{-6}$ ,  $7.45 \times 10^{-6}$ ,  $1.94 \times 10^{-6}$ ,  $1.85 \times 10^{-6}$ ,  $4.91 \times 10^{-6}$  M ตามลำดับ (รูปที่ 6)



รูปที่ 5 ผลของสารสกัดกาวเครือแดงที่ความเข้มข้น (0.01-10 mg/ml) ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบแกนองค

ชาติ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean)  $\pm$  SD



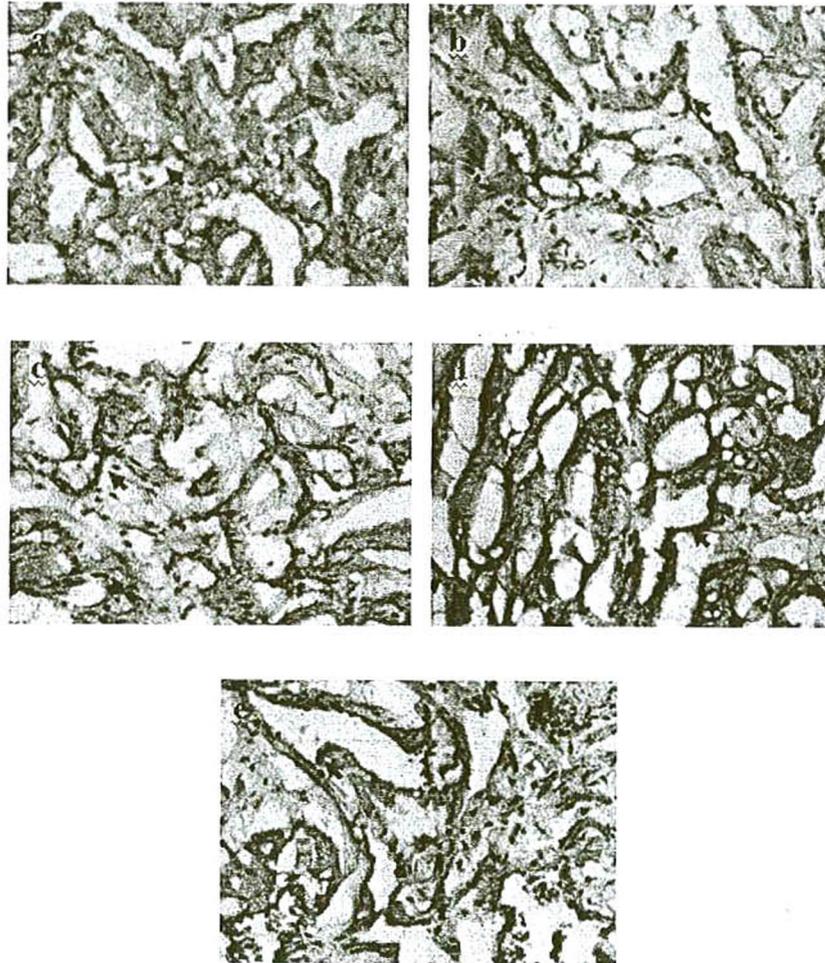
รูปที่ 6 ผลของสาร IBMX ที่ความเข้มข้น ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  mg/ml) ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบแกนองคชาติ

โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean)  $\pm$  SD

## 5. การตรวจวัดหาปริมาณกล้ามเนื้อเรียบโดยเทคนิค immunohistochemistry

เมื่อให้สารสกัดกวางเครือแดงแก่หนูติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการผ่าแยกเอาเฉพาะ เนื้อเยื่อ

Corpora cavernosa ทำการตัดชิ้นเนื้อแล้วย้อมด้วย anti  $\alpha$ -actin monoclonal antibody ผลการทดลองพบว่า ในหนูเบาหวานจะมีปริมาณของ smooth muscle ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 1, 10, 100 mg/ kg BW มีการเพิ่มขึ้นของ smooth muscle อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 10 mg/ kg BW

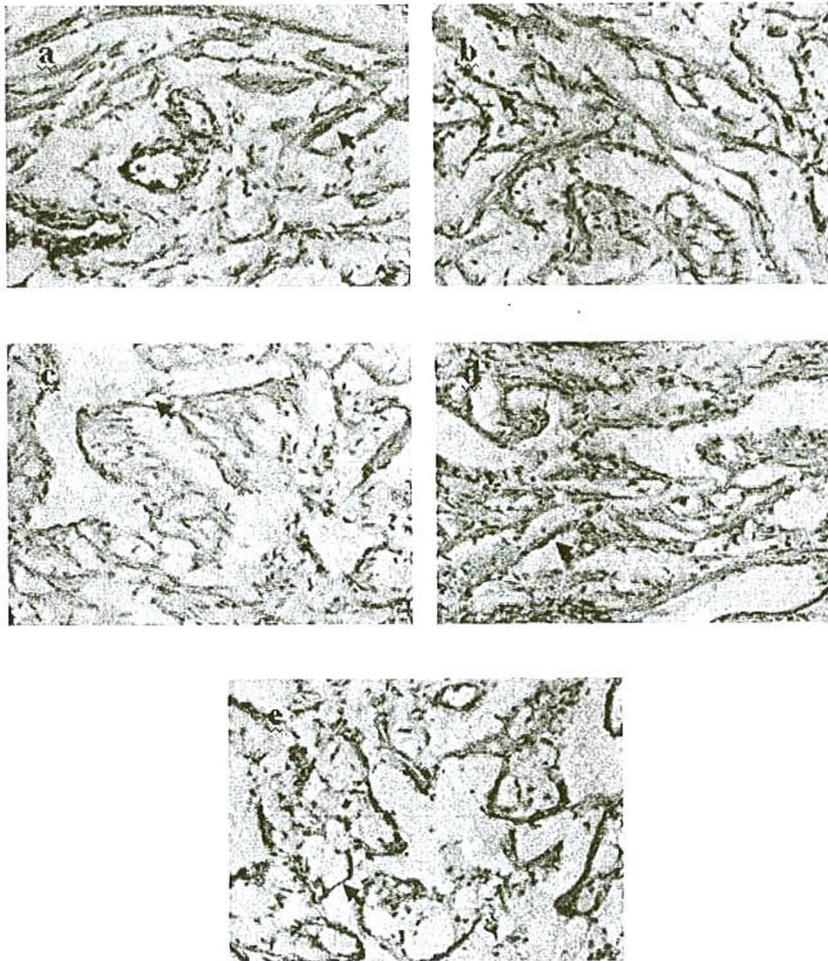


รูปที่ 7 แสดงรูป immunohistochemistry ของกล้ามเนื้อเรียบแกนองคชาต (กำลังขยาย 40 เท่า) ที่ย้อมด้วย  $\alpha$ -actin monoclonal antibodies (a) หนูปกติกลุ่มควบคุม (b) หนูเบาหวาน (c) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 1 mg/ kg (d) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 10 mg/ kg (e) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 100 mg/ kg.). Arrows indicates positive staining for smooth muscle  $\alpha$ -actin.

6. การตรวจวัดหาปริมาณ endothelial โดยเทคนิค immunohistochemistry

เมื่อให้สารสกัดกวางเครือแดงแก่หนูติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการผ่าแยกเอาเฉพาะ เนื้อเยื่อ

Corpora cavernosa ทำการตัดชิ้นเนื้อแล้วย้อมด้วย anti-PECAM-1 monoclonal antibodies ผลการทดลองพบว่า ในหนูเบาหวานจะมีปริมาณของ endothelial ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 1 , 10, 100 mg/ kg BW มีการเพิ่มขึ้นของ smooth muscle อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 10 mg/ kg BW

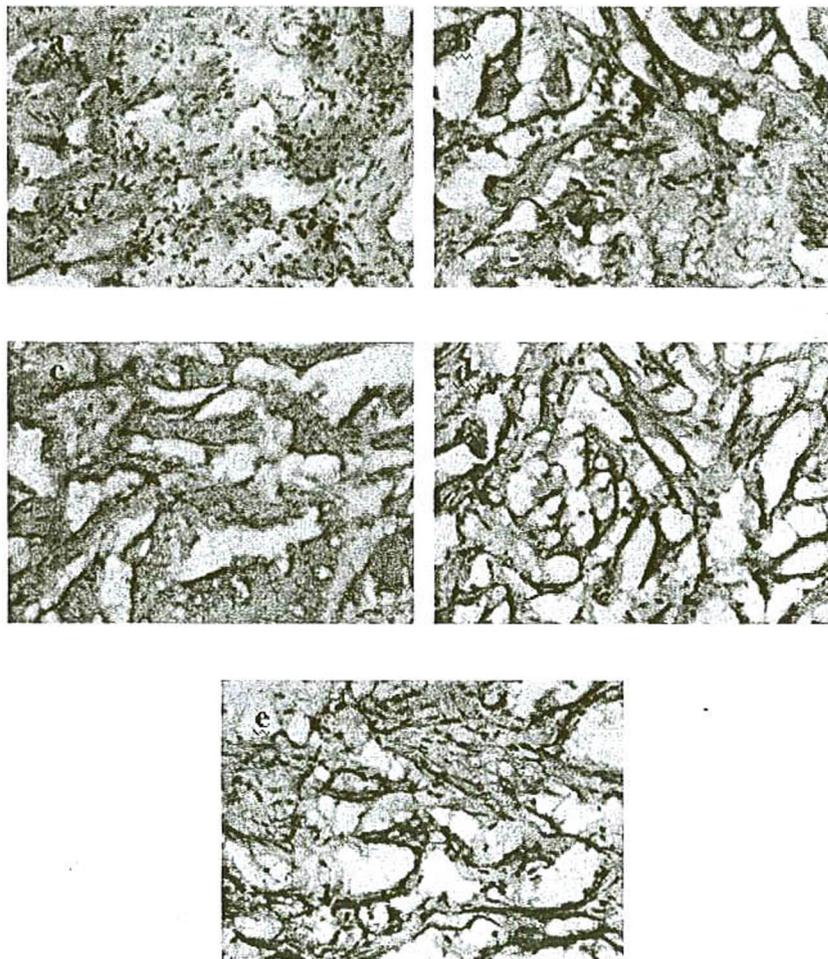


**รูปที่ 8** แสดงรูป immunohistochemistry ของกล้ามเนื้อเรียบแกนองคชาต (กำลังขยาย 40 เท่า) ที่ย้อมด้วย anti-PECAM-1 monoclonal antibodies (a) หนูปกติกลุ่มควบคุม (b) หนูเบาหวาน (c) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 10 mg/ kg (d) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 100 mg/ kg (e) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 100 mg/ kg.). Arrows indicates positive staining for endothelial cells.

## 7. การตรวจวัดหาปริมาณ TGF- $\beta$ 1 โดยเทคนิค immunohistochemistry

เมื่อให้สารสกัดกวางเครือแดงแก่หนูติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการผ่าแยกเอาเฉพาะ เนื้อเยื่อ

Corpora cavernosa ทำการตัดชิ้นเนื้อแล้วย้อมด้วย anti- TGF- $\beta$ 1 monoclonal antibodies ผลการทดลองพบว่า ในหนูเบาหวานจะมีปริมาณของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงถึงปริมาณของ fibrous tissue เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 1 , 10, 100 mg/ kg BW มีการลดลงของ smooth muscle อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 10 mg/ kg BW



รูปที่ 9 แสดงรูป immunohistochemistry ของกล้ามเนื้อเรียบแกองคชาต (กำลังขยาย 40 เท่า) ที่ย้อมด้วย anti-TGF- $\beta$ 1 monoclonal antibodies (a) หนูปกติกลุ่มควบคุม (b) หนูเบาหวาน (c) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 10 mg/ kg (d) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 10 mg/ kg (e) หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดกวางเครือแดง 100 mg/ kg.). Arrows indicates positive staining for TGF- $\beta$ 1.

ตารางที่ 1 แสดงค่า mean area of smooth muscle cells, endothelial cells and the TGF- $\beta$ 1 expression level in the corpora cavernosa

	Normal control	Diabetic control	B. superba extract		
			1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg
Mean % of SM cell area	30.57 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	10.08 $\pm$ 1.55 <sup>b</sup>	15.99 $\pm$ 1.45 <sup>c</sup>	27.08 $\pm$ 1.00 <sup>d</sup>	16.90 $\pm$ 1.53 <sup>c</sup>
Mean % of endothelial cell area	8.29 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	4.00 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	4.78 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	5.78 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	4.07 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
Mean % area of TGF- $\beta$ 1 expression	5.80 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	23.13 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup>	15.33 $\pm$ 1.13 <sup>c</sup>	11.83 $\pm$ 1.95 <sup>d</sup>	17.02 $\pm$ 0.65 <sup>c</sup>

โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean)  $\pm$  SD, <sup>a,b,c</sup> P < 0.05 แสดงข้อมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม