วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของกวาวเครือแดงต่อความดันเลือดในแกนองคชาตในหนูที่เป็นเบาหวาน
2. ศึกษาผลของกวาวเครือแดงต่อปริมาณความหนาแน่นของกล้ามเนื้อเรียบในแกนองคชาตในหนูที่เป็นเบาหวาน
3. ศึกษากลไกของกวาวเครือแดงต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบในแกนองคชาตในหนูที่เป็นเบาหวาน
4. ศึกษาผลของกวาวเครือแดงต่อการแสดงออกของ α smooth muscle actin ในแกนองคชาตในหนูที่เป็นเบาหวาน

วิธีการทดลอง

การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

เสนอรายละเอียดโครงการวิจัย ผ่านคณะแพทยศาสตร์ ต้นสังกัด เพื่อขออนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการพิจารณางานวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สัตว์ทดลอง

หนูแรท เพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-250 กรัม จำนวน 50 ตัวจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงที่ห้องควบคุมแสง light-dark cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 24±1^{0}C

การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน

การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานด้วยการให้สาร streptozotocin ที่ความเข้มข้น 55 mg/kg BW เพียงครั้งเดียว โดยการฉีดสารเข้าทางหลอดเลือด (intravenous injection) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ทำการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดโดยนำหนูมาทำการเก็บเลือดโดยการตัดหางหนูด้านปลายออกเล็กน้อย แล้วจึงนำเลือดที่ได้มาวัดหาระดับน้ำตาลโดยใช้ glucose test kit จากนั้นทำการคัดเลือกหนูในกลุ่มที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงตั้งแต่ 300 mg/dl ขึ้นไป จะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีการสกัดกวาวเครือแดง

นำหัวของกวาวเครือแดงที่ได้หลังจากผ่านการตรวจสอบจากผู้เชี่ยวชาญโดย รศ.ยุทธนา สมิตะสิริ จากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50^{0}C แล้วนำไปบดจนเป็นผงละเอียดแล้วนำไปสกัดด้วยแอทธานอล จากนั้นนำสารที่สกัดได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20^{0}C จนกว่าจะนำมาใช้

การได้รับสารสกัดกวาวเครือแดง

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม เป็นหนูที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน จะได้รับน้ำกลั่นในปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร / ตัว / วัน นาน 2 เดือน กลุ่มที่ 2 เป็นหนูที่เป็นเบาหวาน จะได้รับน้ำกลั่นในปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร / ตัว / วัน นาน 2 เดือน กลุ่มที่ 3, 4 และ 5 เป็นกลุ่มทดลอง และเป็นหนูที่เป็นเบาหวาน จะได้รับสารสกัดกวาวเครือแดงในน้ำกลั่นปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร / ตัว / วัน ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มิลลิกรัม/ตัว/วัน ตามลำดับ เป็นเวลานาน 2 เดือน โดยวิธีป้อนทางปาก

เทคนิคทาง Immunohistochemistry เพื่อหา α-actin ของกล้ามเนื้อเรียบในแกนองคชาต

ตัดแยกกล้ามเนื้อเรียบในแกนองคชาตของหนูทุกกลุ่มออกมาแช่ใน 4% พาราฟอร์มาดีไฮด์ แล้วจึงทำการ embedding เนื้อเยื่อ และทำการตัดเนื้อเยื่อนำไปวางเรียงบนแผ่นสไลด์ แล้วเติมสารละลายที่เป็น blocker สำหรับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peroxide ภายในเซลล์ ทำการล้างสไลด์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติม mouse monoclonal antibody ต่อ α-actin ลงไปทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม second antibody คือ anti-mouse IgG labeled ด้วย biotin ลงไปทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมสารละลาย avidin phosphatase reagent ลงไปทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ขั้นตอนสุดท้ายเติมสารละลาย substrate ที่ทำให้เกิดสีคือ Fast red chromogen ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปสไลด์ทั้งหมดย้อมด้วย hematoxylin

ผลของกวาวเครือแดงต่อความดันเลือดในแกนองคชาต

วิธีการผ่าตัด

หลังจากให้กวาวเครือแดงแล้วเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการสลบหนูด้วย Pentobarbital sodium (Nembutal®, 35 mg/kg) ทางหน้าท้อง จากนั้นทำการเปิดผนังตรงถุงหุ้มอัณฑะให้เห็นส่วนของ corpus cavernosum ใช้เข็มเบอร์ 23 ที่ต่อเข้ากับท่อพลาสติกที่ใส่สารโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.9% แล้วผสมด้วยสารเฮปพารินที่มีความเข้มข้น 100 ยูนิต / มิลลิลิตร ขณะเดียวกันใช้เข็มเบอร์ 23 สอดเข้าไปใน เส้นเลือด Femoral เพื่อวัดความดันปกติของร่างกาย (Mean arterial pressure; MPP) โดยความดันที่วัดทั้งสองตำแหน่งนี้จะต่อกับเครื่องวัดความดันเลือด (Blood pressure transducer) และต่อเข้ากับเครื่องแปลงสัญญาน (Mac Lab/8e ADI Instruments, MA) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ของเครื่อง Macintosh (Mac Lab Software V 4.0, ADI Instruments, MA)

การกระตุ้นการแข็งตัวของแกนองคชาต

ทำการผ่าตัดผนังหน้าท้องหนูแล้วเปิดให้เห็นเส้นประสาท (Cavernous nerve) ที่ติดกับต่อมลูกหมาก จากนั้นใช้ตะขอตัวนำไฟฟ้ามาคล้องเส้นประสาทนี้ไว้ และทำการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ มีความดัน 5 Volts, ความถี่ 20 Hertz เป็นเวลานาน 20 milliseconds

การวัดการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบในแกนองคชาต

นำหนู rat ที่ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวาน มาทำให้สลบแล้วทำการแยก penis ของหนูออกมา จากนั้นทำการผ่าแยกเอาเฉพาะ เนื้อเยื่อส่วน corpus cavernosum แล้วจึงรีบนำเนื้อเยื่อใส่ไว้ในบัฟเฟอร์ HPSS ที่ประกอบด้วย 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 11 mM glucose, pH 7.4 และมี 100% O_2 จากนั้นทำการแขวนชิ้นของเนื้อเยื่อที่ติดกับ probe ที่ติดกับ force transducer ที่ต่อกับเข้ากับเครื่องคอมพิวเตอร์ MacLab สำหรับการอ่านค่าความแรงการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ โดยเริ่มด้วยการหยดสาร phenylephrine เข้าไปเพื่อให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว จากนั้นทำการล้างกล้ามเนื้อด้วยบัฟเฟอร์ แล้วจึงหยดสารสกัดกวาวเครือแดงที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ลงไปเพื่อทดสอบดูการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบในแกนองคชาต โดยทำเปรียบเทียบกับสาร isobutyl-methylxanthine (IBMX) ซึ่งเป็น phosphodiesterase inhibitor เป็นตัวควบคุม