บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1.1 สัตว์ทดลอง

1.1.1 หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar เพศเมีย และเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 150-200 กรัม จากหน่วยงานสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมหนูขาว

- การเตรียมหนูขาวเพื่อศึกษากล้ามเนื้อเรียบมดลูก

เตรียมโดยฉีด estradiol valerate (Progynon Depot^{R}) ขนาด 0.1 mg/kg. body weight ฉีดเข้าใต้ผิวหนังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทำการวิจัย เพื่อให้มดลูกอยู่ในช่วง estrus cycle ซึ่งเป็นระยะที่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกดีและมีความไว (sensitivity) ต่อการตอบสนองต่อ oxytocin

- การเตรียมหนูขาวเพื่อศึกษากล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่

หนูขาวที่จะนำมาศึกษากล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่นั้น ไม่ต้องเตรียมเหมือนกับการศึกษากล้ามเนื้อเรียบมดลูก การเตรียมนั้นใช้หนูขาวเพศใดก็ได้ ซึ่งอยู่ในน้ำหนักที่ระบุไว้ แล้วนำมาแยกหลอดเลือดแดงใหญ่ออกจากกาย

1.1.2 หนูตะเภาสีขาว เพศใดก็ได้ น้ำหนักประมาณ 300-500 กรัม จากฟาร์มผู้เลี้ยง

การเตรียมหนูตะเภา

ให้หนูตะเภาอดอาหารก่อนทำการวิจัย 24 ชั่วโมง ให้น้ำเพียงอย่างเดียว

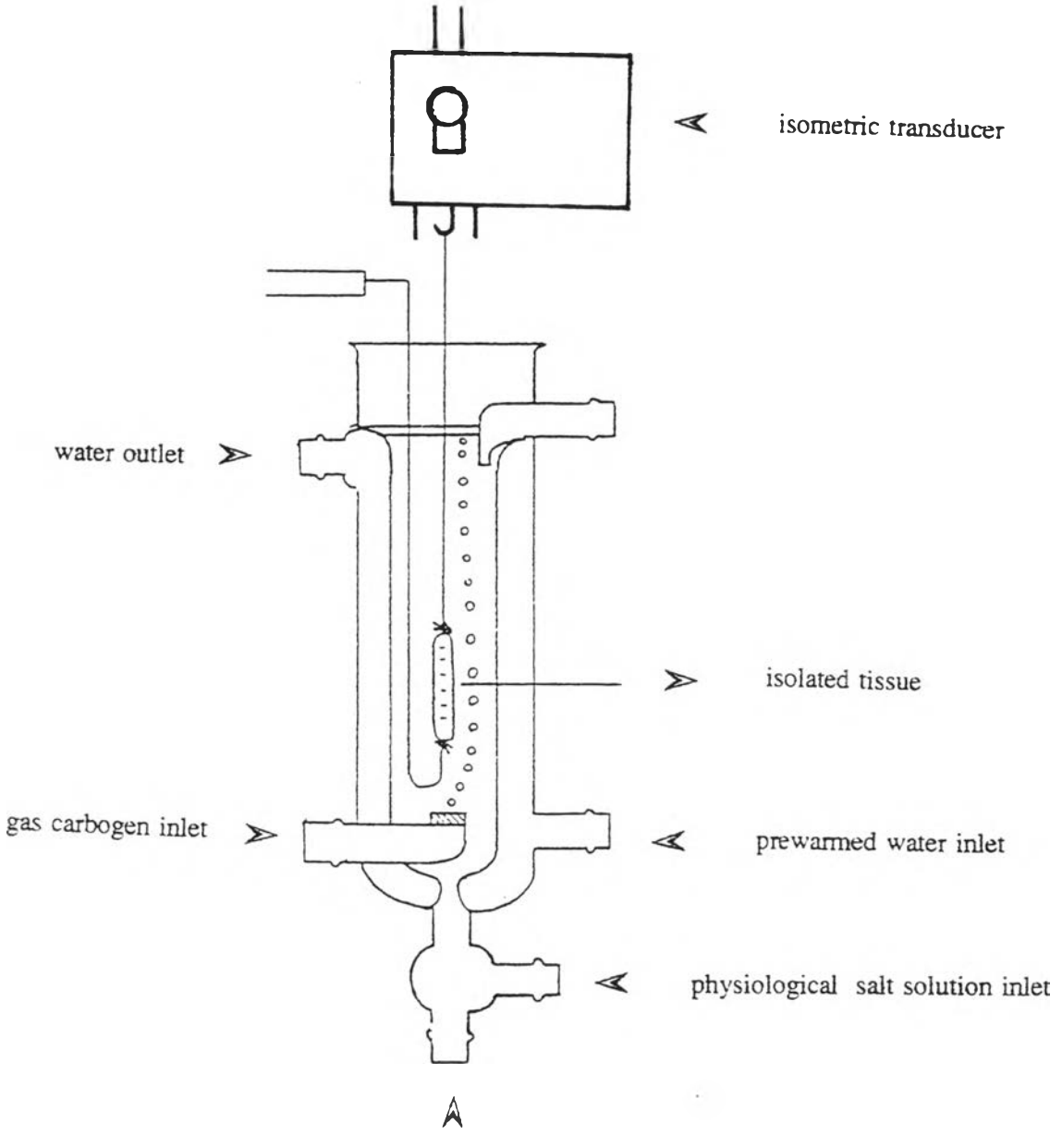
1.2 เครื่องมือ

- organ bath แบบ double walled ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological salt solution) ขนาดบรรจุ 25 ml มี จะมีช่องสำหรับการผ่านเข้าของก๊าซ carbogen ที่ใช้ในการทดลอง (O_2 95 % + CO_2 5 %) ชั้นนอกมีน้ำที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำจาก water bath ซึ่งจะควบคุมน้ำให้มีอุณหภูมิคงที่ (รูปภาพที่ 3)
- เครื่องมือวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (isometric transducer) ของบริษัท Narcro bio-system
- เครื่องมือบันทึกผลการวิจัย (recorder) ของบริษัท Narcor bio-system (Physiograph^R)
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด
- evaporator (Rotavapor)
- ถังบรรจุก๊าซ carbogen (O_2 95 % + CO_2 5 %) ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)

1.3 สารเคมี

1.3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

- oxytocin (syntocinon^R) ของบริษัท Sandoz , Switzerland
- acetylcholine hydrochloride (ACh) ของบริษัท Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
- norepinephrine hydrochloride (NE) ของบริษัท Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
- calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$) (Fluka AG , Buchs, Switzerland.)
- 5-hydroxytryptamine (5-HT) ของบริษัท Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
- histamine ของบริษัท Sigma Chemical Co., Louis, U.S.A.
- barium chloride ($BaCl_2$) (Fluka AG , Buchs , Switzerland.)



รูปภาพที่ 3 แสดงชุดเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบต่าง ๆ ที่แยกจากกาย (isolated organ)

1.3.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological salt solutions)

- sodium chloride ,D(+)-glucose monohydrate , sodium hydrogen carbonate , calcium chloride dihydrate (E . Merck , Darmstadt , Germany.)
- potassium chloride , magnesium chloride hexahydrate (Fluka AG , Buchs , Switzerland.)
- ethylene glycol bis (β-amino ethylether) - N , N , N′ N′- tetraacetic acid (EGTA) (Sigma Chemical Co,.St. Louis, U.S.A.)

1.3.3 สารเคมีที่ใช้เตรียมสัตว์ทดลอง

- estradiol valerate (Progynon Depot®) ของบริษัท Schering , Germany
- coconut oil

1.3.4 สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ

- 95 % ethanol

1.4 สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ (*Asparagus racemosus* Willd.)

สกัดโดยแช่ใน 95 % ethanol เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมากรอง เพื่อแยกเอากากและตะกอนทิ้งไปแล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหย ethanol ออก จะได้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ ที่มีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลดำ นำมาเก็บไว้ในขวดสีชาปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในตู้เย็น

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้จะแบ่งการดำเนินการวิจัยเป็น 3 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาวที่แยกจากกาย

1.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction)

1.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction)

1.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ ต่อการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh

1.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารกระตุ้นการหดตัว oxytocin

1.5 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารกระตุ้นการหดตัว oxytocin ใน calcium-free Locke Ringer solution

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวที่แยกจากกาย

2.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว NE

2.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว NE

2.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว 5-HT

2.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ในสารละลาย potassium depolarizing

ตอนที่ 3 การศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาที่แยกจากกาย

3.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh

3.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh

3.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว 5-HT

3.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว histamine

3.5 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว $BaCl_2$

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาวที่แยกจากกาย

การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว

- เตรียม De Jalon solution แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 32 ± 0.5 °C
- เตรียมหนูขาวตัวเมียก่อนทดลอง 24 ชั่วโมง ด้วยการฉีด estradiol valerate ขนาด 0.1 mg/kg. body weight เข้าใต้ผิวหนัง (Sc) เพื่อให้มดลูกอยู่ในระยะ estrous และทำให้ oxytocin receptor มีความไวในการตอบสนองต่อยาเพิ่มขึ้น
- นำหนูขาวมาเตรียมเอามดลูกโดยตีหัวให้สลบ แล้วกระตุกข้อต่อที่คอให้กระดูกที่คอเลื่อน ซึ่งจะทำให้หนูขาวเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว (cervical dislocation)
- เปิดหน้าท้องของหนูขาว จะเห็นมดลูกของหนูขาว (uterine horn) ตัดมดลูกออกจากตัวหนูขาวทั้ง 2 ข้างแล้วนำไปใส่ใน petri dish ซึ่งมี De Jalon solution และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา
- ค่อย ๆ เลาะ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันที่ติดอยู่ที่มดลูกออกให้หมด
- ตัดมดลูกให้มีความยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร จะได้มดลูก 4 ชิ้น นำมดลูกแต่ละชิ้นมาผ่าตามยาวจะได้เนื้อเยื่อ 2 ชิ้นต่อมดลูก 1 ชิ้น (รูปภาพที่ 4)
- ใช้ด้ายผูกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อมดลูกที่ตัดเรียบร้อยแล้ว นำไปยึดติดกับแผ่นพลาสติกซึ่งยึดติดกับ organ bath
- organ bath ชั้นในสุดมีความจุ 25 มิลลิลิตร บรรจุ De Jalon solution อยู่ และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา ส่วน organ bath ชั้นกลางจะมีน้ำอุณหภูมิ 32 ± 0.5 °C ไหลผ่านตลอดเวลา
- ปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อมดลูกที่ตัดเรียบร้อยแล้วนั้น จะผูกติดกับ isometric

transducer ซึ่งต่อกับ recorder

- เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยตามขั้นต้นแล้ว ปรับเนื้อเยื่อให้มีแรงตึง 0.5 กรัม incubate เนื้อเยื่อเป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเริ่มการทดลอง ในขณะที่ทำการ incubate อยู่นั้นเปลี่ยน De Jalon solution ทุก ๆ 15 นาที

1.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบ ต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction)

บันทึกการหดตัวของมดลูก 15 นาที (โดยใช้สารละลาย De Jalon solution ที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 °C) แล้วจึงให้ 95 % ethanol 20 µl บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีก 15 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังให้ ethanol

1.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction)

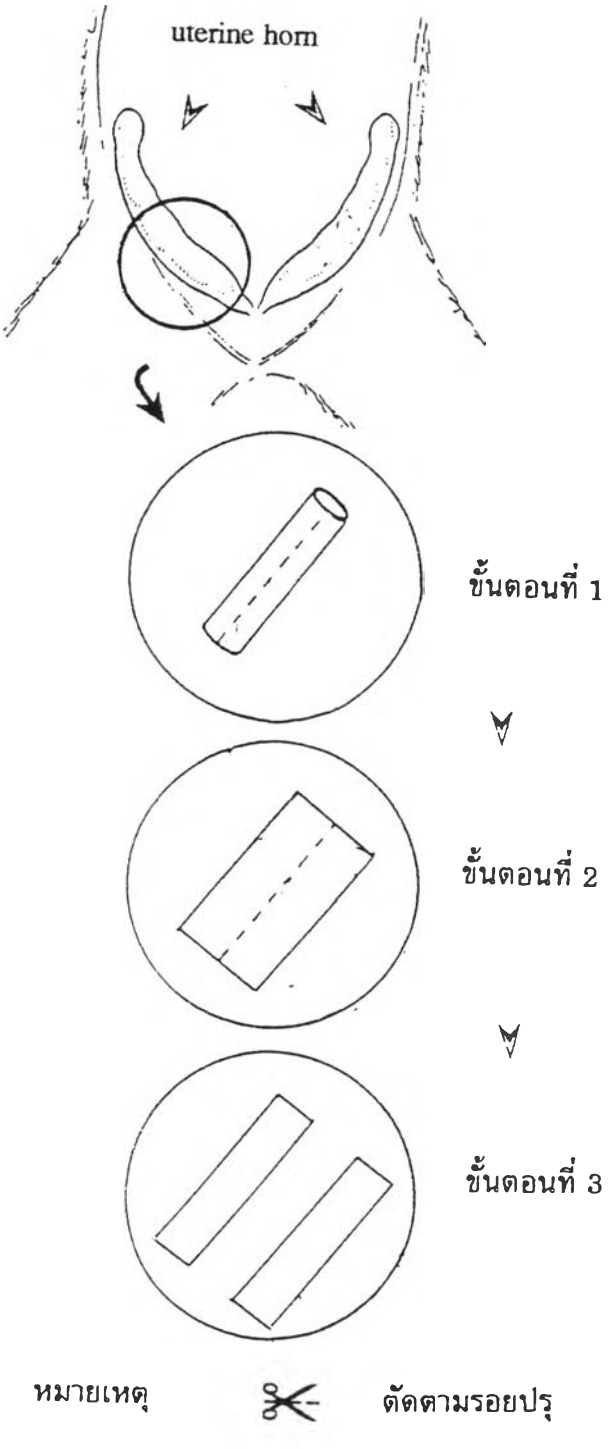
บันทึกการหดตัวของมดลูก 15 นาที (โดยใช้ De Jalon solution ที่ อุณหภูมิ 37 ± 0.5 °C) แล้วจึงให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.2 mg/ml บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีก 15 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองก่อนและหลังการให้สารสกัด ethanol จากรากสามสิบ

1.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh

ให้ ACh $5x10^{-6}$ M ซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้เกิดการหดตัวของมดลูกได้ 65-75 % ของการหดตัวสูงสุด (submaximum dose) บันทึกผลการหดตัวของมดลูก 15 นาที แล้วให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.2 mg/ml บันทึกผล 15 นาที แล้วให้ ACh ขนาดเท่าเดิม บันทึกผล เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

1.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารกระตุ้นการหดตัว oxytocin

ให้ oxytocin $5x10^{-3}$ IU/ml ซึ่งเป็นขนาดกระตุ้นการหดตัวของมดลูกได้ 65-75 %



รูปภาพที่ 4 แสดงตำแหน่งและลักษณะของมดลูกและวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว (isolated rat uterus)

ของการหดตัวสูงสุด (submaximum dose) บันทึกผลการหดตัวของมดลูก 15 นาที แล้วให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.2 mg/ml บันทึกผล 15 นาที แล้วให้ oxytocin ขนาดเท่าเดิม บันทึกผลเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

1.5 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูก เมื่อให้สารกระตุ้นการหดตัว oxytocin ใน calcium-free Locke Ringer solution

เปลี่ยนน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น calcium-free Locke Ringer solution + 0.2 mM EGTA incubate นาน 30 นาที แล้วให้ oxytocin 0.02 IU/ml กระตุ้น การหดตัวของมดลูก บันทึกผล 15 นาที แล้วล้างมดลูกด้วย Locke Ringer solution หลาย ๆ ครั้ง incubate กล้ามเนื้อเรียบมดลูก ประมาณ 45-60 นาที เพื่อให้มดลูกพักเต็มที่โดยเปลี่ยน Locke Ringer solution ทุก ๆ 15 นาที เปลี่ยนน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น calcium-free Locke Ringer solution + 0.2 mM EGTA incubate นาน 30 นาที แล้วให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.2 mg/ml บันทึกผล 15 นาที แล้วให้ oxytocin ในขนาดเท่าเดิมบันทึกผล 15 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวที่แยกจากกาย

<u>การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว</u>

- เตรียม Krebs-Henseleit solution แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 0.5 ^{o}C
- นำหนูขาวมาเตรียมเอาหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยตีหัวให้สลบแล้วกระตุกข้อต่อที่คอให้กระดูกที่คอเลื่อนซึ่งจะทำให้หนูเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว (cervical dislocation)
- เปิดหน้าอกของหนูขาว แล้วเคลื่อนย้ายหัวใจ ปอด ฯลฯ (ส่วนที่บังหลอดเลือดแดงใหญ่) ออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่ที่กระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่แล้วใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ไปจนถึงหัวใจ แล้วจึงตัดหลอดเลือดแดงใหญ่ ซึ่งจะมีความยาวประมาณ 3 เซนติเมตร นำหลอดเลือดแดงใหญ่ไปวางไว้ใน petri dish ซึ่งมี Krebs-Henseleit solution และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา
- ล้างเลือดที่ติดอยู่ในหลอดเลือดแดงใหญ่ให้หมด แล้วค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันที่ติดอยู่ที่หลอดเลือดแดงใหญ่ออกให้หมด
- ตัดหลอดเลือดแดงใหญ่ให้เป็นรูปเกลียว โดยให้มีความกว้างประมาณ 2-3 มิลลิ-

เมตร ยาว 2.0-2.5 เซนติเมตร ซึ่งจะได้หลอดเลือดแดง 2 ชิ้น (รูปภาพที่ 5)

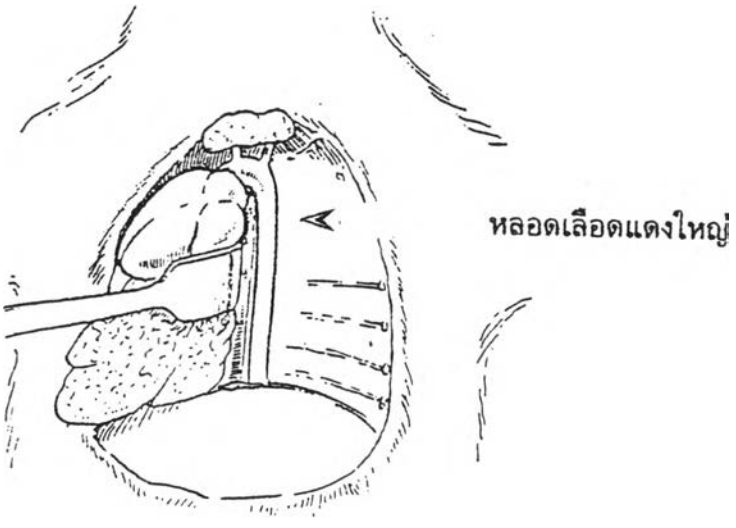
- ใช้ด้ายผูกด้านหนึ่งของหลอดเลือดที่ตัดเรียบร้อย แล้วนำไปยึดติดกับแผ่นพลาสติกซึ่งยึดติดกับ organ bath
- organ bath ชั้นในสุดมีความจุ 25 มิลลิลิตร บรรจุ Krebs-Henseleit solution อยู่และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา ส่วน organ bath ชั้นกลางจะมีน้ำอุณหภูมิ 37 ± 0.5 ^{o}C ไหลผ่านตลอดเวลา
- ปลายอีกด้านหนึ่งของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ตัดเป็นรูปเกลียว (spiral) แล้วผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งต่อกับ recorder
- เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยตามขั้นต้นแล้ว ปรับให้เนื้อเยื่อมีแรงตึง 0.5 กรัม incubate เนื้อเยื่อเป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเริ่มการทดลอง ในขณะที่ incubate อยู่นั้น เปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุก ๆ 15 นาที

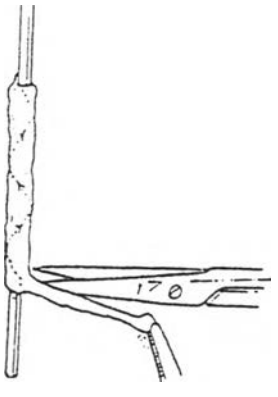
2.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว NE

ศึกษา cumulative dose-response curve ของสาร NE โดยให้ NE ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-11}$,$1x10^{-10}$,$1x10^{-9}$,$1x10^{-8}$, $1x10^{-7}$ M ลงในหลอดเลือดที่เตรียมไว้ ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม NE หลังจากนั้นล้าง NE ออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้ง incubate หลอดเลือด 45 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดพักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อไปโดยให้ 95 % ethanol 20 µl ลงในหลอดเลือดบันทึกผล 5 นาที แล้วจึงให้ NE ความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้ 95 % ethanol

2.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว NE

ศึกษา cumulative dose-response curve ของสาร NE โดยให้ NE ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-11}$,$1x10^{-10}$,$1x10^{-9}$,$1x10^{-8}$, $1x10^{-7}$ M ลงในหลอดเลือดที่เตรียมไว้ ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม NE หลังจากนั้นล้าง NE ออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้ง incubate หลอดเลือด 45 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดพักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.6 mg/ml ลง





วิธีการตัดแบบเกลียว (spiral)

รูปภาพที่ 5 แสดงตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว (isolated rat aorta)

ในหลอดเลือดบันทึกผล 5 นาที แล้วจึงให้ NE ความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

2.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว 5-HT

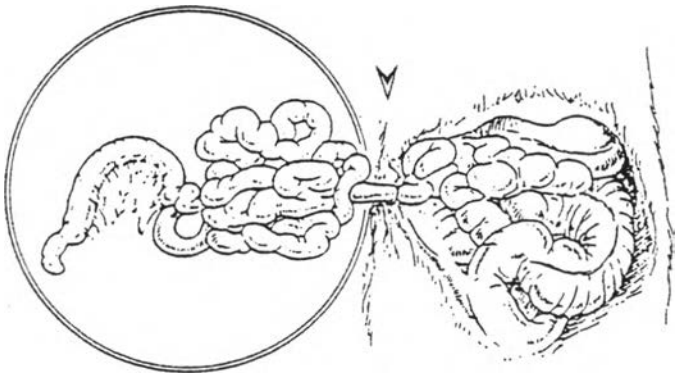
ศึกษา cumulative dose-response curve ของสาร 5-HT โดยให้ 5-HT ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-8}$,$1x10^{-7}$,$1x10^{-6}$,$1x10^{-5}$, $1x10^{-4}$ M ลงในหลอดเลือดที่เตรียมไว้ ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 5-HT หลังจากนั้นล้าง 5-HT ออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้ง incubate หลอดเลือด 45 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดพักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.6 mg/ml ลงในหลอดเลือดบันทึกผล 5 นาที แล้วจึงให้ 5-HT ความเข้มข้นต่าง ๆ หมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

2.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ให้หดตัวโดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ในสารละลาย potassium depolarizing

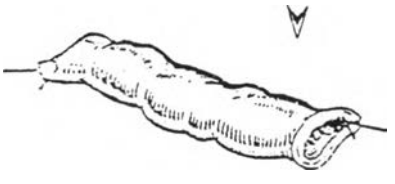
เตรียมหลอดเลือดแดง incubate โดย calcium-free Krebs-Hensleit solution โดยเปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 15 นาที จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลายจาก calcium-free Krebs-Hensleit solution เป็นสารละลาย potassium depolarizing ต่อจากนั้น incubate หลอดเลือด จนกระทั่งกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ ศึกษาผลของการหดตัวของหลอดเลือด โดยให้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์แบบสะสม (cumulative dose-response curve) ที่ขนาดความเข้มข้น 0.1 mM , 1 mM , 10 mM , 20 mM , 30 mM หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Hensleit solution หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลาย จาก Krebs-Hensleit solution มาเป็นสารละลาย calcium-free Krebs-Hensleit solution หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่จึงเปลี่ยนสารละลาย calcium-free Krebs-Hensleit solution เป็นสารละลาย potassium depolarizing เพื่อให้หลอดเลือดพร้อมที่จะหดตัว ทำการศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ โดยให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.6 mg/ml ก่อนนานประมาณ 5 นาที แล้วจึงให้ สารละลายแคลเซี่ยมคลอไรด์แบบสะสมขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

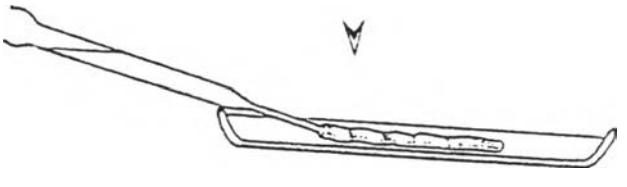
ileo-caecal junction



วิธีการผูกลำไส้เล็กส่วน ileum



การล้าง lumen



รูปภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งลำไส้เล็กส่วน ileum และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา (isolated guinea-pig ileum)

ตอนที่ 3 การศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาที่แยกจากกาย

<u>การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา</u>

- เตรียม Tyrode solution แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 ^{o}C
- ให้หนูตะเภาอดอาหารก่อนทดลอง 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความไวในการหดตัวของลำไส้และทำให้ลำไส้สะอาด
- นำหนูตะเภามาเตรียมเอาลำไส้เล็กส่วน ileum โดยตีหัวให้สลบ แล้วกระตุกข้อต่อที่คอให้กระดูกที่คอเลื่อน ซึ่งจะทำให้หนูเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว (cervical dislocation)
- เปิดหน้าท้องของหนูตะเภาจะเห็นส่วน ileo-caecal junction และตัดส่วน ileum ซึ่งจะตัดตั้งแต่เหนือ ileo-caecal junction ไปทางลำไส้เล็ก ตัดยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร นำลำไส้เล็กส่วน ileum ไปวางไว้ใน petri dish ซึ่งมี Tyrode solution และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา
- ค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และไขมันที่ติดอยู่ที่ลำไส้เล็กส่วน ileum ออกให้หมดทำความสะอาด lumen โดยการใช้กระบอกฉีดยาฉีดเอา Tyrode solution ผ่าน lumen หลาย ๆ ครั้ง (รูปภาพที่ 6)
- ตัดลำไส้เล็กส่วน ileum ออกเป็นชิ้น ซึ่งแต่ละชิ้นมีความยาว 1.0-1.5 เซ็นติเมตร
- ใช้ด้ายผูกด้านหนึ่งของลำไส้เล็กส่วน ileum ที่ตัดเรียบร้อยแล้วและนำไปยึดติดกับแผ่นแผ่นพลาสติกที่ยึดติดกับ organ bath
- organ bath ชั้นในสุดมีความจุ 25 มิลลิลิตร บรรจุ Tyrode solution อยู่และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลาส่วน organ bath ชั้นกลางจะมีน้ำอุณหภูมิ 37 ± 0.5 ^{0}C ไหลผ่านตลอดเวลา
- ปลายอีกด้านหนึ่งของลำไส้เล็กส่วน ileum ที่ตัดเรียบร้อยแล้วนั้นจะนำมาผูกติดกับกับกับ isometric transducer ซึ่งต่อกับ recorder
- เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยตามขั้นต้นแล้วปรับให้เนื้อเยื่อมีแรงตึง 0.5 กรัม incubate เนื้อเยื่อเป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเริ่มการทดลอง ขณะที่ incubate อยู่นั้นเปลี่ยน Tyrode solution ทุก ๆ 15 นาที

3.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh

ศึกษา cumulative dose-response curve ของ ACh โดยเติมสาร ACh ที่ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-9}$,$1x10^{-8}$,$1x10^{-7}$,$1x10^{-6}$,$1x10^{-5}$ M ลงในลำไส้ที่เตรียมไว้ ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมสาร ล้างลำไส้ด้วย Tyrode solution หลาย ๆครั้ง incubate ลำไส้ประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้พักเต็มที่ ศึกษาต่อไปโดยให้ 95 % ethanol 20 µl ลงในลำไส้ บันทึกผล 5 นาที แล้วให้ ACh ความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้ 95 % ethanol

3.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh

ศึกษา cumulative dose-response curve ของ ACh โดยเติมสาร ACh ที่ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-9}$,$1x10^{-8}$,$1x10^{-7}$,$1x10^{-6}$,$1x10^{-5}$ M ลงในลำไส้ที่เตรียมไว้ ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมสาร ล้างลำไส้ด้วย Tyrode solution หลาย ๆ ครั้ง incubate ลำไส้ประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้พักเต็มที่ ศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.08 mg/ml ลงในลำไส้ บันทึกผล 5 นาที แล้วให้ ACh ความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

3.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว 5-HT

ศึกษา cumulative dose-response curve ของ 5-HT โดยเติมสาร 5-HT ที่ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-9}$,$1x10^{-8}$,$1x10^{-7}$,$1x10^{-6}$,$1x10^{-5}$ M ลงในลำไส้ที่เตรียมไว้ ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมสาร ล้างลำไส้ด้วย Tyrode solution หลาย ๆ ครั้ง incubate ลำไส้ประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้พักเต็มที่ ศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.08 mg/ml ลงในลำไส้ บันทึกผล 5 นาที แล้วให้ 5-HT ความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

3.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วนส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว histamine

ศึกษา cumulative dose-response curve ของ histamine โดยเติมสาร histamine ที่ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-9}$,$1x10^{-8}$,$1x10^{-7}$,$1x10^{-6}$,$1x10^{-5}$ M ลงในลำไส้ที่เตรียมไว้ ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมสาร ล้างลำไส้ด้วย Tyrode solution หลาย ๆ ครั้ง incubate ลำไส้ประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้พักเต็มที่ ศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.08 mg/ml ลงในลำไส้ บันทึกผล 5 นาที แล้วให้ histamine ความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้ สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

3.5 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว $BaCl_2$

ศึกษา cumulative dose-response curve ของ histamine โดยเติมสาร $BaCl_2$ ที่ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-5}$,$5x10^{-5}$,$1x10^{-4}$,$5x10^{-4}$,$1x10^{-3}$ M ลงในลำไส้ที่เตรียมไว้ ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมสาร ล้างลำไส้ด้วย Tyrode solution หลาย ๆ ครั้ง incubate ลำไส้ประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้พักเต็มที่ ศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.08 mg/ml ลงในลำไส้ บันทึกผล 5 นาที แล้วให้ $BaCl_2$ ความเข้มข้นต่าง ๆ เหมือนกับตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการให้ สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ

<u>การทดสอบความคงตัวของสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ</u>

- ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction)ในระยะเวลาที่ห่างจากการศึกษาครั้งแรก (ข้อ 1.1 ประมาณ 3 เดือน)

บันทึกการหดตัวของมดลูก 15 นาที (โดยใช้ De Jalon solution ที่ อุณหภูมิ 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}C$) แล้วจึงให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ 0.2 mg/ml บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีก 15 นาที เปรียบเทียบผลการหดตัวระหว่างก่อนและหลังการให้สารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบ การทดลองกลุ่มนี้จะทำการทดลองหลังจากทดลองในหัวข้อ 3.5 เสร็จสิ้นแล้ว และนำผลการทดลองที่ได้จากกลุ่มนี้เปรียบเทียบกับการทดลองในหัวข้อ 1.1

3. การวัดผลและการนำเสนอผลการวิจัย

1. การวัดผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก ซึ่งวัดได้ 2 ลักษณะคือ

- วัดแรงในการหดตัวเฉลี่ย (tension)

$$= \frac{\text{ผลรวมของแรงในการหดตัวทุกครั้งในเวลาหนึ่ง}}{\text{จำนวนครั้งของการหดตัวในเวลาหนึ่ง}}$$

- วัดความถี่ในการหดตัว (frequency)

= จำนวนครั้งของการหดตัว (ครั้ง/นาที)

การนำเสนอผลการวิจัย จะนำเสนอดังนี้

- ร้อยละของแรงหดตัวในการหดตัวเฉลี่ย (tension)
- ร้อยละของความถี่ในการหดตัว (frequency)

2. การวัดผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่

วัดขนาดของการหดตัวของหลอดเลือดแดงเป็นมิลลิเมตร ของแต่ละความเข้มข้นของสารกระตุ้นมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ของการหดตัว (contraction) โดยให้ maximum contraction = 100 %

การนำเสนอผลการวิจัย จะนำเสนอดังนี้

- dose-response curve ในรูปเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction)

3. การวัดผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum

วัดขนาดของการหดตัวของหลอดเลือดแดงเป็นมิลลิเมตร ของแต่ละความเข้มข้นของสารกระตุ้นมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction) โดยให้ maximum contraction = 100 %

การนำเสนอผลการวิจัย จะนำเสนอดังนี้

- dose-response curve ในรูปเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of mean)

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบก่อนและหลังได้รับสารสกัดด้วยเอธานอลของรากสามสิบ ใช้สถิติ student's paired-t test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

สำหรับการทดสอบความคงตัวของสารสกัดด้วยเอธานอลของรากสามสิบ เป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองจะใช้สถิติ student's unpaired-t test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (เติมศรี ชำนิจารกิจ, 2531)