บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูแรท (Wistar Rat) เพศเมีย อายุประมาณ 2-3 เดือน น้ำหนัก 150-230 gm. จากศูนย์สัตว์ทดลอง ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล

2. กระเทียม

กระเทียมแกะกลีบพันธุ์ไต้หวันหรือพันธุ์ไทยใหญ่ ซึ่งปลูกมากในจังหวัดเชียงใหม่

3. เครื่องมือ

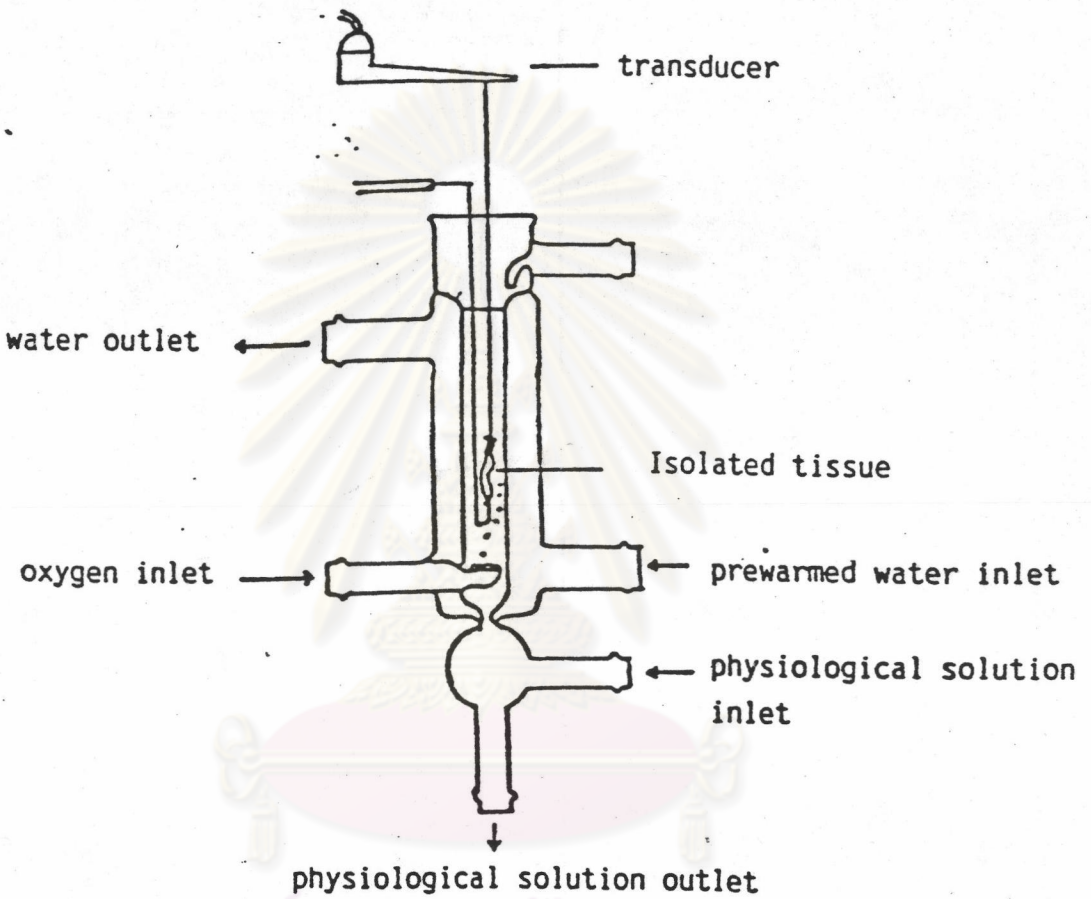
3.1 Water jacked organ bath ใช้แบบ double walled Churchill type ซึ่งประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในมีความจุ 20 มิลลิลิตร เป็นชั้นที่บรรจุสารละลายที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ สำหรับการทดลองนี้ใช้ De Jalon's solution ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นใน ให้คงที่ตามที่ต้องการ คือ 37°C โดยจะมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำให้ไหลเข้า-ออกในชั้นนี้ water jacked organ bath จะมีช่องเป็นทางเปิดให้อากาศ (ประกอบด้วยออกซิเจน 95% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5%) ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นใน(รูปที่ 1)

3.2 Isometric transducer

3.3 Dynograph type R (Beckman)

3.4 Blender

3.5 Separator



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 เครื่องมือ isolated organ bath

3.6 Rota Vapour

3.7 Thin Layer Chromatography (TLC)

4. สารทดลอง

- Propranolol HCl
- Phentolamine
- Acetylcholine chloride
- Isoproterenol
- Atropine sulphate
- Norepinephrine
- Verapamil
- Sodium sulphate anhydrous

5. วิธีการทดลอง

5.1 การสกัดกระเทียม

5.1.1 กระเทียม 100 กรัม ผสมรวมกับคลอโรฟอร์ม 120 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย blender นาน 20 วินาที

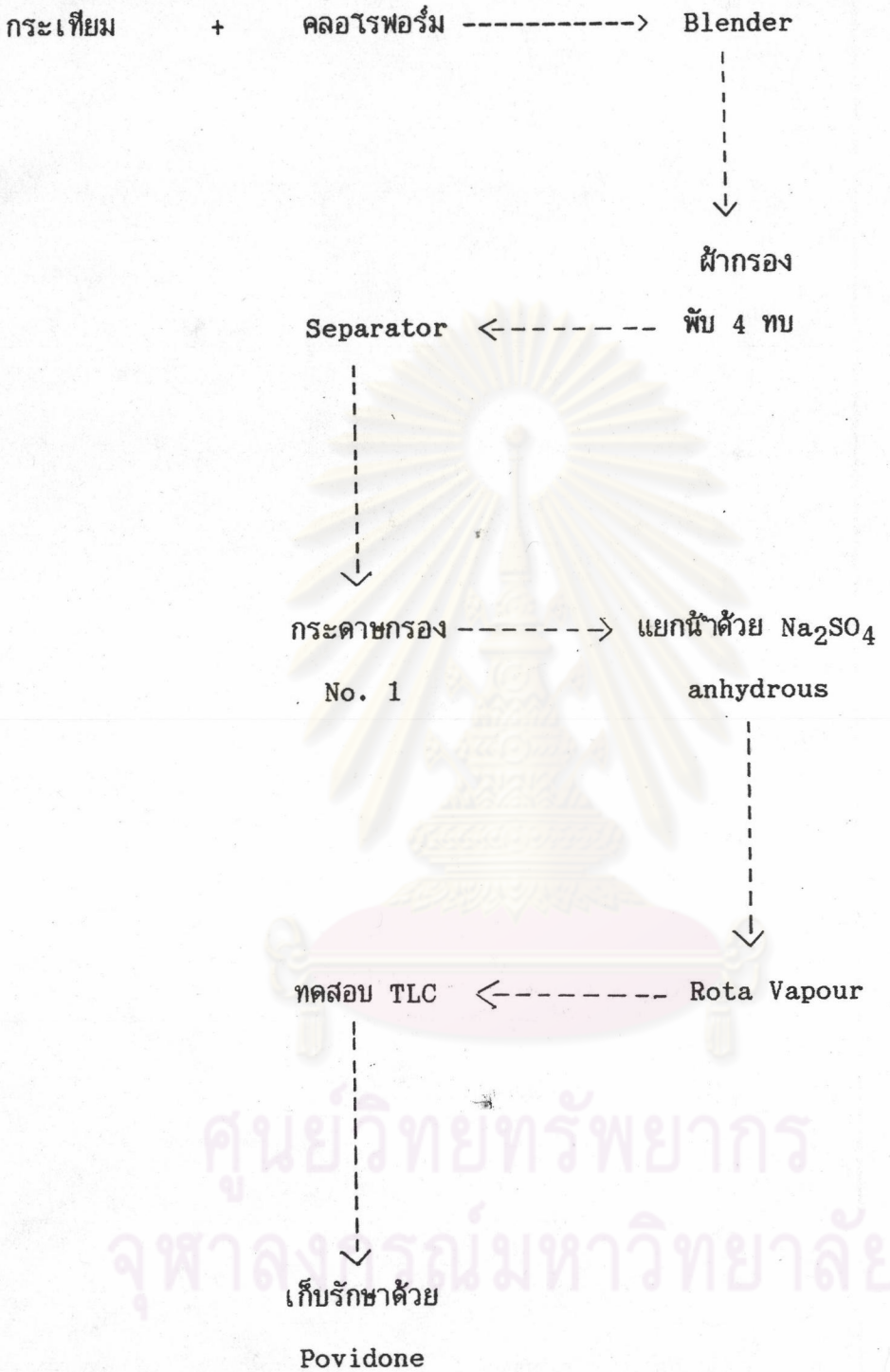
5.1.2 แยกส่วนตะกอนออกโดยใช้ผ้ากรองพับหนา 4 ทบ separator และกระดาษกรอง No.1 ตามลำดับ และแยกน้ำออกโดยใช้สาร sodium sulphate anhydrous

5.1.3 แยกคลอโรฟอร์มออกโดยใช้เครื่อง Rota Vapour ที่อุณหภูมิ 55°C ได้ crude oil สีเหลืองเข้ม

5.1.4 ทดสอบ crude oil โดยวิธี thin layer chromatography ได้ค่า Rf. 0.70-0.75

5.1.5 เก็บรักษาโดยใช้สาร povidone

ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ขั้นตอนแสดงการสกัดกระเทียม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดกระเทียม สามารถสรุปได้ดังนี้

กระเทียม	100	กรัม
สารละลายคลอโรฟอร์ม	120	ซีซี
สาร povidone	1.2	กรัม
อัลลิซิน	5%	
รวมสารผสม	7 กรัม/100 กรัมกระเทียม	
ทดสอบ TLC ได้ค่า Rf.	0.70-0.75	

5.2 การเตรียมสารละลายอัลลิซิน

นำสารสกัดอัลลิซิน ซึ่งรวมตัวเป็นสารผสมในรูปของแข็งหนัก 1 กรัมนำมาละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของสารสกัดอัลลิซิน 70 mg/ml โดยจะแตกตัวให้สารอัลลิซินและสาร povidone ซึ่ง supernatant ที่ได้นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:20 จะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดอัลลิซิน 3.5 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการหดตัวดีที่สุด (Somsak Borvonsin, Thaval Rerksngarm and Krittika Chumpolbunchorn, 1989 ; Saha and Kasinathan, 1961)

5.3 การเตรียมสัตว์ทดลอง

5.3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อมดลูก

การศึกษาครั้งนี้ใช้มดลูกหนูแรทระยะ estrus ซึ่งเป็นระยะที่มีการหดตัวดีที่สุด (Brown, 1955) โดยดูจาก vaginal smear ทำให้หนูแรทหมดความรู้สึกโดยวิธีดึงกระดูกคอ (dislocated) แล้วผ่าเปิดหน้าท้องเอา uterine horns ออกวางในจานแก้วที่มี De Jalon's solution มีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งมีออกซิเจน 95% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลาที่แช่ชิ้นเนื้ออยู่ แยกเนื้อเยื่อไขมันที่ติดกับ horns ออก ตัด horns ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร

5.3.2 การเตรียม organ bath

ผูกปลายทั้ง 2 ข้างของ uterine horns แต่ละข้างให้แน่นด้วยด้าย นำปลายข้างหนึ่งผูกติดกับ water jacked organ bath อีกข้างหนึ่งผูกติดกับ

isometric transducers แล้วต่อกับ Dynograph โดย horns จะแช่อยู่ใน water jacked organ bath ความจุ 20 มิลลิลิตร ที่มี De Jalon's solution และออกซิเจน 95%, คาร์บอนไดอ๊อกไซด์ 5% ผ่านอยู่ตลอดเวลา ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 37 ^{0}c

ขณะทดลองปรับ transducers ให้ตึงและถ่วงชิ้นเนื้อด้วยน้ำหนัก 1 กรัม ตลอดเวลา เพื่อ equilibrate ให้กล้ามเนื้อตึงตัว

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ De Jalon's solution

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)
NaCl	9.0
KCl	0.42
$NaHCO_3$	0.5
$CaCl_2$	0.06
Glucose	0.5
H_2O	1,000 ml
pH = 7.4	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017532

5.4 การดำเนินการทดลอง

5.4.1 ศึกษาผลของสารสกัดอัลลิซินต่อการหดตัวของมดลูก

5.4.1.1 ใช้สารสกัดอัลลิซินที่เตรียมจาก 5.2 ในปริมาณ 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 มิลลิลิตร ดูผลการหดตัวของมดลูกโดยตรง

5.4.2 ศึกษาผลของสารสกัดอัลลิซินต่อ muscarinic receptor ของมดลูกหนูแรท โดยใช้ atropine เนื่องจาก atropine เป็น competitive antagonist ที่ muscarinic receptor ของ postglanglionic พาราซิมพาเธติคของกล้ามเนื้อเรียบ (Innes and Nicherson, 1975)

5.4.2.1 ให้ atropine ความเข้มข้น 10^{-4} M ซึ่งเป็นความเข้มข้น ที่ให้ผลดีต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ (อัจฉรา ภูพิพัฒน์ผล,2524) สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที แล้วตามด้วยสารสกัดอัลลิซินปริมาณ 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 ml บันทึกผลการหดตัวของมดลูก แล้วล้างออก 2-3 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.4.3 ศึกษาผลของ acetylcholine ต่อการหดตัวของมดลูก หลังจากให้ atropine

5.4.3.1 หา dose ที่เหมาะสมของ acetylcholine โดยใช้ acetylcholine ในความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-4}, และ 10^{-3} M ตามลำดับ ที่ทำให้มดลูกหดตัวได้ 90-95% ของการหดตัวสูงสุดมาเป็น standard dose ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้น 10^{-4}M

5.4.3.2 ใส่ standard dose ของ acetylcholine สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออก 2-3 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ ซึ่งจะนำมาใช้เป็น control

5.4.3.2 ใส่ atropine ในความเข้มข้น 10^{-4}, 10^{-3} และ 10^{-2} M ตามลำดับ สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย standard dose ของ acetylcholine บันทึกผลของการหดตัวของมดลูก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4.4 ศึกษาผลของสารสกัดอัลสิซินต่อ beta-receptor ของมดลูกหนูแรท โดยใช้ propranolol, isoproterenol เนื่องจาก propranolol เป็น beta antagonist ให้ผลดีที่สุดในกล้ามเนื้อของมดลูกหนูแรท (Wasserman and Levy, 1972) และ isoproterenol เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อ beta adrenergic receptors ของ myometrium ทำให้เกิดการคลายตัว (O'Donnell, Pesson and Wanstall, 1978)

5.4.4.1 ให้ isoproterenol ในความเข้มข้น 10^{-8}, 10^{7}, 10^{-6} และ 10^{-5} M ตามลำดับ สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 2 นาที เลือกปริมาณของ isoproterenol ที่ทำให้มดลูกหนูแรทคลายตัวได้ 40-50% ของการหดตัวสูงสุด ได้แก่ isoproterenol ความเข้มข้น 10^{-6} M แล้วล้างออก 2-3 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.4.4.2 ให้ propranolol ในความเข้มข้น 10^{-5}M ซึ่งเป็นความเข้มข้น ที่ให้ผลดีต่อการทำงานของมดลูกหนูแรท (Bickoff,1963) สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที แล้วตามด้วย isoproterenol ในความเข้มข้น 10^{-6} M บันทึกผลการหดตัวของมดลูก แล้วล้างออก 2-3 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.4.4.3 ให้สารสกัดอัลสิซินในปริมาณที่ทำให้มดลูกมีการหดตัวเป็น 90-95% ของการหดตัวสูงสุด ในปริมาณที่เลือกได้จาก 5.4.1 จากการทดลองได้ 0.8 ml โดยให้สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที ตลอดการทดลอง แล้วล้างออก 2-3 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ ซึ่งจะนำมาใช้เป็น control

5.4.4.4 ให้ propranolol ในความเข้มข้น 10^{-5}M สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที แล้วตามด้วย standard dose ของสารสกัดอัลสิซิน ตาม 5.4.4.3 บันทึกผลการหดตัวของมดลูก

5.4.5 ศึกษาผลของสารสกัดอัลสิซินต่อ alpha-receptor ของมดลูกหนูแรท โดยใช้ norepinephrine, phentolamine เนื่องจาก norepinephrine เป็นสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้น alpha adrenergic receptors ของมดลูกหนูทำให้เกิดการหดตัว (Bisset, Haldor and Lewin, 1966) และ phentolamine เป็น alpha antagonist ให้ผลยับยั้ง norepinephrine ในมดลูกได้ (Wikberg, 1979)

5.4.5.1 ให้ norepinephrine ในความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-4} และ 10^{-3} M ตามลำดับ สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 2 นาที เลือกปริมาณของ norepinephrine ที่ทำให้มดลูกหดตัวได้เป็น 90-95% มาเป็น standard dose ได้แก่ norepinephrine ปริมาณ 10^{-4} M แล้วล้างออก 2-3 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.4.5.2 ให้ phentolamine ในความเข้มข้น 10^{-4} M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลดีต่อการทำงานของมดลูกหนูแรท (Estan และคณะ, 1985) สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที แล้วตามด้วย norepinephrine ในความเข้มข้น 10^{-4} M บันทึกผลการหดตัวของมดลูก แล้วล้างออก 2-3 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.4.5.3 เตรียม standrad dose ของสารสกัดอัลสิซิน ตาม 5.4.4.3 สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออก 2-3 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.4.5.4 ให้ phentolamine ในความเข้มข้น 10^{-4} M สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 5 นาที แล้วตามด้วย standard dose ของสารสกัดอัลสิซิน ตาม 5.4.1 บันทึกผลการหดตัวของมดลูก

5.4.6 ศึกษาผลของสารสกัดอัลสิซินต่อ Ca-blocker ของมดลูกหนูแรท โดยใช้ verapamil เนื่องจาก verapamil เป็น calcium antagonist สามารถปิดกั้นทางเข้าของ calcium ได้ (Maigaard และคณะ, 1983)

5.4.6.1 ให้ verapamil ในความเข้มข้น 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7} และ 10^{-6} M ตามลำดับ สัมผัสกับมดลูก 9 นาที เลือกปริมาณของ verapamil ที่ทำให้มดลูกคลายตัวได้เป็น 80 % ของ control มาเป็น standard dose ได้แก่ verapamil ปริมาณ 10^{-6} M แล้วล้างออก 2-3 ครั้งจนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.4.6.2 ให้ verapamil ในความเข้มข้น 10^{-6} M สัมผัสกับมดลูกเป็นเวลา 9 นาที แล้วตามด้วยสารสกัดอัลสิซินปริมาณ 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 ml ตามลำดับ บันทึกผลการหดตัวของมดลูก

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

6.1 ใช้ค่า mean และ standard error of the mean (SEM) ในการวิเคราะห์การหดตัวหรือการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

6.2 ใช้ student's paired t-test โดยเปรียบเทียบความแตกต่างในการหดตัวของมดลูก เมื่อให้สารต่าง ๆ โดยค่า P จะต้องน้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย