บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง, สมุนไพร, เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ

- สัตว์ทดลอง : หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ (Wistar strain rat) เพศผู้น้ำหนักประมาณ 110-130 กรัม จากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา จ.นครปฐม หนูที่ส่งมาใหม่จะเลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนทำการวิจัย เพื่อให้หนูมีการปรับตัว และคุ้นเคยกับสถานที่เลี้ยงใหม่

- สมุนไพร : เก็บมาจากบริเวณเขื่อนจุฬาภรณ์ จ.ชัยภูมิ และเขื่อนสิรินธร จ. ชัยนาท นำมาอบให้แห้งประมาณ 5-7 วัน

- เคมีภัณฑ์และแหล่งที่มา

1. Indomethacin (Sigma Chemical Company)
2. Ibuprofen (Sigma Chemical Company)
3. Prednisolone (Sigma Chemical Company)
4. Methyl cellulose (Sigma Chemical Company) 1,500 CPS
5. Carrageenan Type IV, Lambola carrageenan (Sigma Chemical Company)
6. Heparin; from Porcine Intestinal Mucesa 50,000 USP unit (Sigma Chemical Company)
7. Sodium chloride (E. Merck)
8. Alcohol 95% (องค์การเภสัชกรรม)

9. Tincture Iodine (องค์การเภสัชกรรม)

10. Diethyl ether (May and Baker LTD.)

11. Wetting Compound (Imbibente(R)) (Ugo basile)

12. Acetic acid (May and Baker LTD.)

- วัสดุและแหล่งที่มา

1. สำลีปลอดเชื้อโดยรังสีแกมมา (บริษัทเคนดอลล์-แกมมาตรอน จำกัด)

2. ขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิดสำหรับใส่ specimen (วิทยาศรม)

- เครื่องมือและแหล่งที่มา

1. Plethysmometer Model 7150 (UGO BASILE) เป็นเครื่องมือสำหรับวัดปริมาตรการบวม โดยวัดบริเวณเท้าของหนูขาว หลักการทำงานของเครื่องมือใช้หลักแทนที่น้ำโดยมีหลอดแก้วรูปทรงกระบอกขนาดสูง 6 ซม. จำนวน 2 หลอด มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 และ 2 ซม.ทั้งสองหลอด มีช่องเล็กๆเป็นทางเชื่อมติดต่อได้เมื่อใส่สารละลายลงไป ในการวัดปริมาตรที่เปลี่ยนแปลงจะวัดด้วย Volume transducer ค่าที่อ่านได้เป็นตัวเลข มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร (แสดงในรูปที่ 4)

2. Biological Microscope No.155020 (Nikon optiphot, Japan)

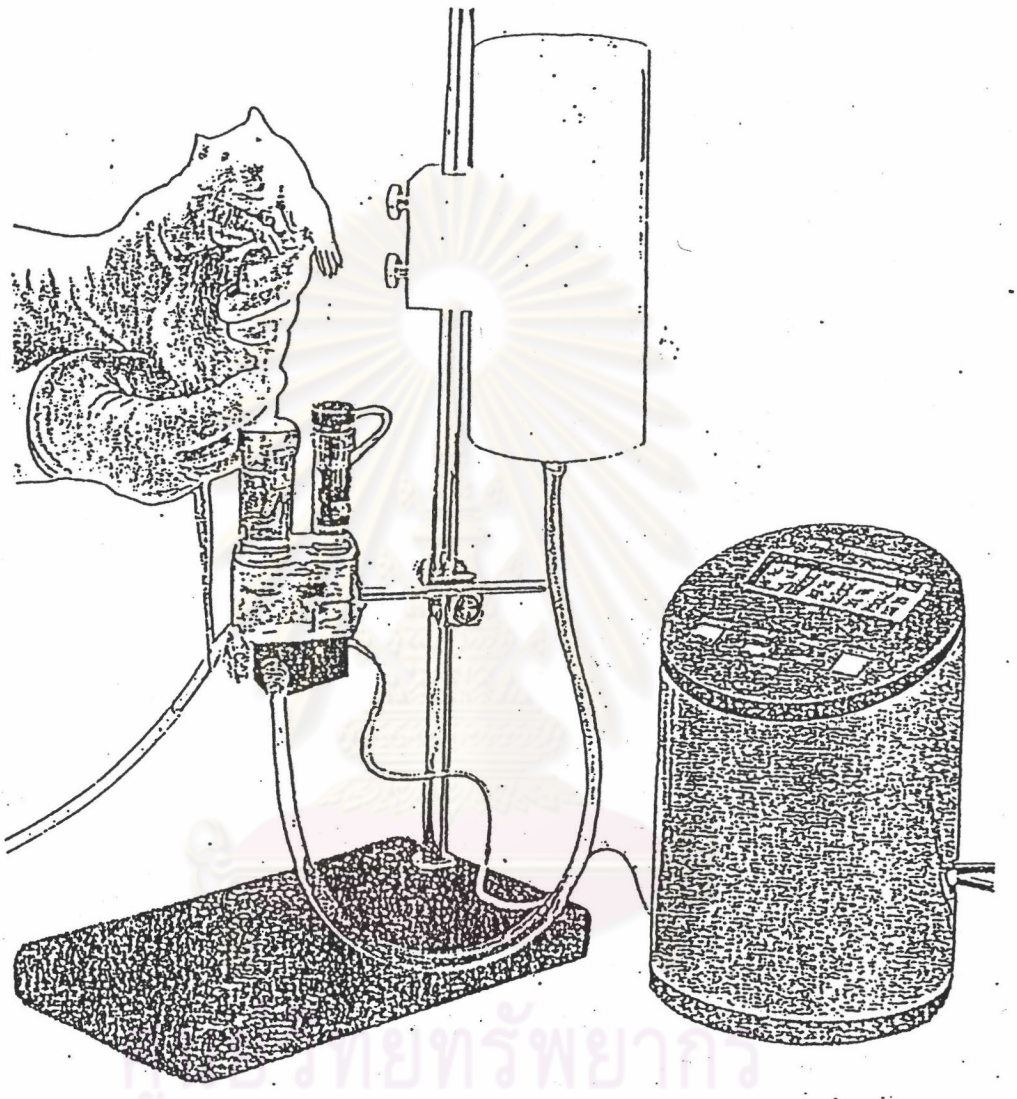
3. Hemacytometer or "Bright-Line" counting Chamber, Improved double Neubauer Ruling (AO scientific)

4. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (บริษัทวิศววิทย์)

5. ปิเปตต์สำหรับเจือจางเม็ดเลือดขาว

6. Dropper (วิทยาศรม)

7. เครื่องมือผ่าตัดและเย็บแผล พร้อมด้ายและเข็มเย็บ (วิทยาศรม)



รูปที่ 4 ภาพแสดง Plethysmometer และวิธีการใช้วัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอนการสกัดสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์จากเปลือกต้นตาเสือทุ่ง
2. การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้

1. การสกัดสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์จากเปลือกต้นตาเสือทุ่ง

วิธีการสกัด : นำเปลือกของต้นตาเสือทุ่งมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในตู้อบแห้งใช้เวลาประมาณ 7 วัน นำเอาเปลือกไม้ที่แห้งแล้วไปบดให้เป็นผงละเอียดแล้วนำไปหมักกับ absolute methanol เป็นเวลา 7 วัน จึงนำมากรองส่วนที่กรองได้ (methanol extract) นำไประเหยไล่ methanol จะได้ residue แห้งแล้วนำกากที่เหลือไปสกัดด้วย absolute methnol แล้วทำตามที่กล่าวมาจนได้ residue อีก 2 ครั้ง แล้วนำ residue ที่ได้ทั้งหมดมารวมกันแล้วละลายด้วย methanol บดผสมกับ Kieselguhr คลุกให้เข้ากันดีแล้วตั้งบน water bath เพื่อระเหยเอา methanol ออกให้หมด เมื่อแห้งแล้วนำไปบรรจุ percolater ใช้ hexane สกัดแยกส่วนสารจำพวก nonpolar ออกให้หมด นำกากที่เหลือใน percolater มาระเหยบน water bath เพื่อไล่ hexane ที่เหลือ แล้วนำไปบดให้ละเอียด บรรจุใน percolater ใช้ chloroform เป็น solvent สกัด นำส่วนที่สกัดได้คือ chloroform extract ไประเหยจนแห้ง จะได้สารอัลคาลอยด์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ (crude alkaloids) ที่ต้องการ นำอัลคาลอยด์ที่ได้ไปทำให้สะอาดขึ้นโดยนำไปละลายในสารละลาย 10% glacial acetic acid กรองแล้วทำให้เป็นด่างด้วยแอมโมเนีย แล้วสกัดด้วย choloform นำส่วนของ choloform ที่แยกได้ไประเหยจนแห้งจะได้ residue ของอัลคาลอยด์ นำไปทำให้บริสุทธิ์โดย column chromatograhpy ใช้ column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้วที่บรรจุด้วย silica gel ใช้ solvent ที่ประกอบด้วย $CHCl_3$:MeOH อัตราส่วน 6:4 เป็น eluent filtrate ที่ไหลออกมา แยกเก็บเป็นส่วน (fraction) ส่วนละ 50 มล. แต่ละ fraction ที่เก็บได้จะนำไป spot บน TLC plate เคลือบด้วย silica gel ด้วย Dragendorff's reagent ซึ่งเป็น spraying reagent พบว่า fraction ช่วงที่มี alkaloid มากที่สุดคือ fraction ที่ 14-34 จากนั้นจึงนำ fraction 14-34 ตั้ง

ทิ้งไว้ให้อัลคาลอยด์ตกผลึกแล้วนำไปกรองแยกผลึก ผลึกที่ได้นำมาทดสอบด้วยวิธี TLC เพื่อดูความบริสุทธิ์ แล้วนำผลึกที่ได้มาบดเป็นผงละเอียด ขั้นตอนการสกัดสารอัลคาลอยด์จากเปลือกต้นตาเสือทุ่งได้ตามแผนภาพ ในรูปที่ 5

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากเปลือกต้นตาเสือทุ่ง

การเตรียมยาและสารชนิดต่างๆ

ก. การเตรียม 1% methyl cellulose

เตรียมสารปริมาตร 500 ซีซี โดยชั่งผง methyl cellulose 5 กรัม โปรยสารทีละน้อยลงในน้ำอุ่น ใช้แท่งแก้วคนเบาๆจนผง methyl cellulose พองตัวเต็มที่เก็บใส่ขวด ปิดฝา ติดฉลากเป็น stock solution สำหรับเตรียมยาแขวนตะกอนต่อไป

ข. การเตรียม 1% carrageenan in 0.9% sodium chloride solution

ชั่ง carrageenan 0.1 กรัม แล้วนำมาใส่ในสารละลาย 0.9% Sodium chloride จำนวน 10 มล. ใส่ขวดปิดฝาให้มิดชิดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 1-2 วัน เพื่อให้ carrageenan พองตัวเต็มที่

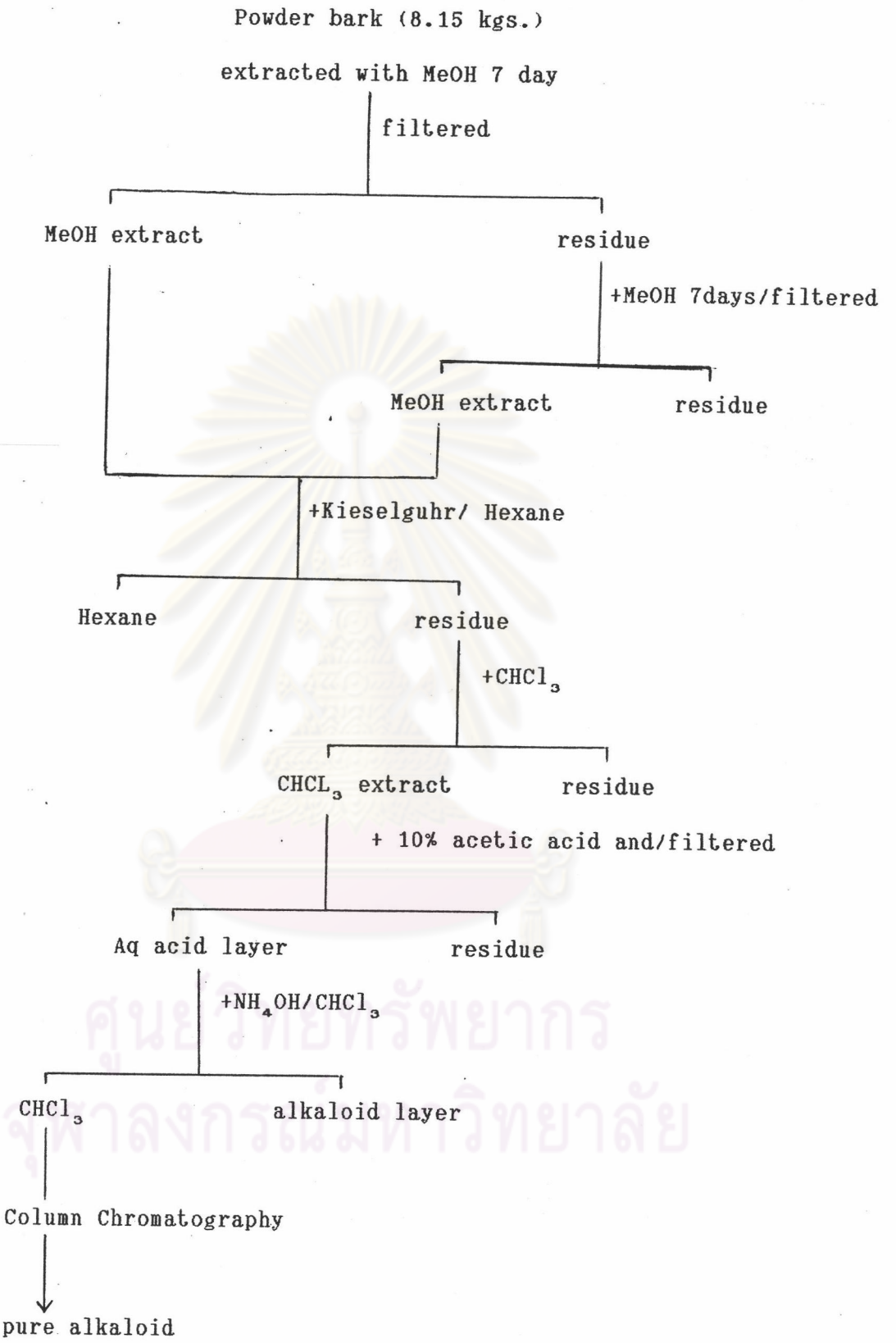
ค. การเตรียมสารละลาย wetting compound

ใช้ wetting compound 4-5 มล. และ sodium chloride 0.4-0.5 กรัม ผสมรวมกันในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร ใส่ขวดปิดฝาให้มิดชิดเก็บเป็น stock solution ใช้สำหรับวัดปริมาตรอุ้งเท้าของหนูขาว

ง. การเตรียม 10 mg% Heparinized saline

นำผง Heparin 20 mg มาละลายใน 0.9% Sodium chloride 200 ซีซี จะได้สารละลาย Heparinized saline จำนวน 200 มล. เก็บไว้ในตู้เย็น

จ. การเตรียม 1% aqueous solution of acetic acid



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงสารอัลคาลอยด์จากต้นตาเสือทุ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใช้ปิเปตต์ขนาด 1 มล. ดูด acetic acid มา 1 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้สารละลายจำนวน 100 มล. ใส่ขวดปิดฝาให้มิดชิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ฉ. การเตรียมยาแขวนตะกอนของ prednisolone

ชั่ง prednisolone จำนวน 10 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้แขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล.

ช. การเตรียมยาแขวนตะกอนของ Indomethacin

ชั่ง Indomethacin จำนวน 5 มก.และ 10 มก. จึงนำไปบดทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulosบดจนยาเข้ากันดี แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. ทั้ง 2 อันจะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้น 0.5 มก./มล. และ 1 มก./มล.

ซ. การเตรียมยาแขวนตะกอน Ibuprofen

ชั่ง Ibuprofen จำนวน 20 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้แขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 มก./มล.

ฌ. การเตรียมยาแขวนตะกอนตาเสือทุ่ง

- ขนาดสารที่ให้สัตว์ทดลอง 3 มก./นน.หนู 1 กก. ชั่งสารสกัดตาเสือทุ่งจำนวน 5 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มก./มล.

- ขนาดสารที่ให้สัตว์ทดลอง 6 มก./นน.หนู 1 กก. ชั่งสารสกัดตาเสือทุ่งจำนวน 10 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล.

- ขนาดสารที่ให้สัตว์ทดลอง 9 มก./นน.หนู 1 กก. ชั่งสารสกัดตาเสือทุ่ง จำนวน 20 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 มก./มล.

- ขนาดสารที่ให้สัตว์ทดลอง 15 มก./นน.หนู 1 กก. ชั่งสารสกัดตาเสือทุ่ง จำนวน 30 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3 มก./มล.

- ขนาดสารที่ให้สัตว์ทดลอง 22 มก./นน.หนู 1 กก. ชั่งสารสกัดตาเสือทุ่ง จำนวน 40 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้แขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 4 มก./มล.

- ขนาดสารที่ให้สัตว์ทดลอง 30 มก./นน.หนู 1 กก. ชั่งสารสกัดตาเสือทุ่ง จำนวน 50 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้แขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 มก./มล.

- ขนาดสารที่ให้สัตว์ทดลอง 40 มก./นน.หนู 1 กก. ชั่งสารสกัดตาเสือทุ่ง จำนวน 60 มก. นำมาบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. จะได้แขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 6 มก./มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วิธีดำเนินการวิจัย</u> แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1. ศึกษาผลจากสารสกัดจากสมุนไพรตาเสือทุ่ง ต่อการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูจากการฉีดสารกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ

2. ศึกษาผลจากสารสกัดจากสมุนไพรตาเสือทุ่ง ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่เกิดการอักเสบโดยการฝังสำลี เปรียบเทียบกับยาต้าน

การอักเสบ

3. ศึกษาผลจากสารสกัดจากสมุนไพรตาเสือทุ่ง ต่อการยับยั้งการเกิด granuloma ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยวิธีการฝังสำลี เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ

4. ศึกษาผลจากสารสกัดจากสมุนไพรตาเสือทุ่งต่อการยับยั้งการเจ็บปวด ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการเจ็บปวดด้วย acetic acid เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการศึกษาการอักเสบชนิดเฉียบพลัน (Acute inflammation) โดยใช้ model carrageenan foot edema test ตามวิธีการของ Winter, Risley and Nuss(1962) โดยการฉีด carrageenan เข้าที่อุ้งเท้าของหนูขาว เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอาการบวมของอุ้งเท้าของหนูขาว โดยมีขั้นตอนในการทดลองดังนี้

1. เตรียมหนูขาวที่จะนำมาทำการทดลอง โดยงดอาหารหนูแต่ให้กินน้ำตามปกติ เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชม.ก่อนทำการทดลอง เพื่อป้องกันมิให้อาหารไปรบกวน bioavailability ของยา

2. ชั่งนน.หนูแต่ละตัว เพื่อใช้คำนวณปริมาณยาที่จะให้

3. ขีดเส้นรอบข้อเท้าหนูบริเวณกระดูก lateral malleolus เป็นแนวที่จะใช้วัดปริมาตรของอุ้งเท้า

4. วัดปริมาตรอุ้งเท้าหนูก่อนทำการฉีด carrageenan ด้วยเครื่อง Plethysmometer

5. ฉีดสารละลาย 1% carrageenan in 0.9% Sodium chloride ปริมาตรที่ฉีด 0.05 มล. เข้าที่บริเวณใต้อุ้งเท้าหนู (Subplantar injection) ชั้นใต้ผิวหนัง (Subcutaneous)

6. วัดปริมาตรอุ้งเท้าหนูอีกครั้งเมื่อครบ 3 ชม.หลังจากฉีด carrageenan ที่ทำให้อุ้งเท้าหนูเกิดการบวม

7. กรณีที่จะทำการทดสอบยา หรือสารอื่นๆ ว่ามีผลต่ออาการบวมหรือไม่นั้น จะทำการให้สารหรือยานั้นก่อนฉีด carrageenan เป็นเวลา 1 ชม. โดยให้ทางปาก ปริมาตรไม่เกิน 10 มล./นน.ตัว 1 กก. แล้วจึงทำการฉีด carrageenan เมื่อครบกำหนดเวลาที่ให้

model of carrageenan foot edema test

รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำให้อุ้งเท้าหนูขาวเกิดอาการบวม (carrageenan foot edema test) และวิธีการทดสอบฤทธิ์ของยาต้านการอักเสบและสารสกัดอัลคาลอยด์ตาเสือทุ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการศึกษา โดยแบ่งหนูขาวเป็นกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่ม โดยให้ยาทางปากโดยใช้ feeding syring ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 4 กลุ่มๆละ 6 ตัว

- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Prednisolone ขนาด 5 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Indomethacin ขนาด 5 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Ibuprofen ขนาด 10 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ 1% methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 6 กลุ่มๆละ 6 ตัว

- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 3 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 6 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 9 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 15 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 22 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ 1% methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม

การคำนวณเปอร์เซนต์ในการยับยั้งอาการบวม

การกระตุ้นให้อุ้งเท้าหนูเกิดการอักเสบด้วย 1% carrageenan in 0.9% NaCl solution ตามวิธีการของ Winter, el at.(1962) พบว่าปริมาตรของอุ้งเท้าหนูที่บวมมากที่สุดจะใช้เวลาประมาณชั่วโมงที่ 3 ดังนั้นจึงวัดปริมาตรอุ้งเท้าหนูหลังจากฉีด carrageenan ในชั่วโมงที่ 3 และกำหนดค่าต่างๆดังต่อไปนี้

- ให้ V_o เป็นปริมาตรของอุ้งเท้าหนูที่วัดก่อนการเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าหนูเกิดการอักเสบ โดยใช้แนวเส้นที่ทำเครื่องหมายบริเวณ lateral malleolus เป็นเกณฑ์ทำการวัดที่ข้างขวาของหนูทุกตัว

- ให้ V_d เป็นปริมาตรของอุ้งเท้าหนูกลุ่มที่ได้รับยาหรือสารที่จะทดสอบก่อน 1 ชม.และได้รับการฉีด 1% carrageenan เข้าใต้ผิวหนังบริเวณอุ้งเท้าหนู วัดปริมาตร

ของอุ้งเท้าหนูในชั่วโมงที่ 3 หลังจากฉีด 1% carrageenan

- ให้ V_e เป็นปริมาตรของอุ้งเท้าหนูกลุ่มควบคุม (ได้รับ 1% methyl cellulose) ที่ได้รับการฉีด 1% carrageenan เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอาการบวม วัดปริมาตรของอุ้งเท้าหนูในชั่วโมงที่ 3 หลังจากฉีด 1% carrageenan แล้ว

โดยที่ปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าหนู (Volume of edema) จะเท่ากับ ปริมาตรอุ้งเท้าโดยวัดที่ 3 ชั่วโมงหลังฉีด carrageenan ลบด้วยปริมาตรอุ้งเท้าหนูก่อนฉีด carrageenan ดังนั้น ปริมาตรการบวมในกลุ่มควบคุม = $V_e - V_p$ และ ปริมาตรการบวมในกลุ่มที่ได้รับยา = $V_d - V_p$

การคำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้งการบวม ได้จาก

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(V_e - V_p) - (V_d - V_p)}{(V_e - V_p)} \times 100$$

$$= \frac{V_e - V_d}{V_e - V_p} \times 100$$

$$= \left(1 - \frac{V_e - V_p}{V_e - V_p}\right) \times 100$$

การทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารเพื่อการศึกษาใช้วิธีการทางสถิติคือ Analysis of Variance เมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรตาเสือทุ่ง ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการอักเสบ (leucocyte migration) เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ

ขั้นตอนที่ 2 นี้เป็นการศึกษาการอักเสบเฉียบพลันอีกแบบหนึ่ง ทำให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการอักเสบด้วยการฝังสำลี (Exudative of inflammation cotton pellet implantation) เป็นการกระตุ้นให้เกิด inflammatory exudates (ประกอบด้วยของเหลวและเซลล์เม็ดเลือดขาว) ตามวิธีของ Winter et al.(1963) ; Higgs, Flower and Vane (1979) ; Boyle and Mangan(1982) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งนน.หนูขาวแต่ละตัว เพื่อใช้คำนวณขนาดยาที่จะให้

2. เตรียมสำลีปลอดเชื้อ (sterile) น้ำหนัก 40 $\pm$ 1 มก./ชิ้น

3. แช่เครื่องมือผ่าตัดและด้ายเย็บแผล ในแอลกอฮอล์ 70% นานประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคก่อนนำมาใช้

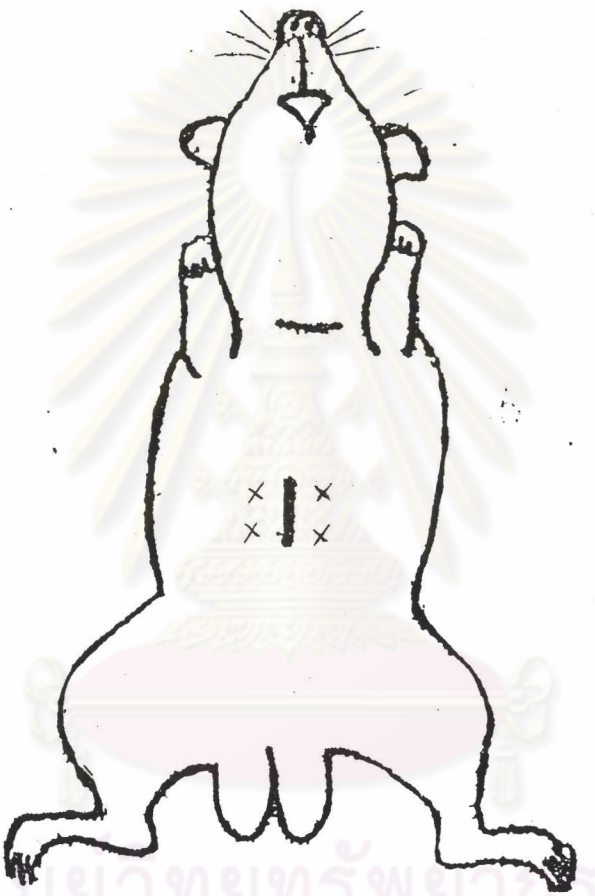
4. เมื่อทำการผ่าตัดฝังสำลีจะทำให้หนูสลบด้วย ether ตลอดเวลาที่ทำการผ่าตัดฝังสำลี และเย็บแผล

5. เช็ดผิวหนังบริเวณกลางหน้าท้องก่อนทำการผ่าตัดด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน การผ่าตัดจะตัดลึกถึงชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) แผลยาวประมาณ 1.5 ซม. (ดังในรูปที่ 7) จากนั้นจะฝังสำลีชุบด้วย 1% carrageenan ในสารละลาย 0.9% Sodium chloride ปริมาตร 1 มล.ต่อสำลี 1 ชิ้น

6. เย็บปิดแผลด้วยด้ายสีดำ แบบ interrupted suture ประมาณ 2-3 stiches

7. หลังจากนั้นเลี้ยงหนูตามปกติ เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จึงทำการฆ่าหนูด้วยอีเธอร์

8. ผ่าตัดเอาสำลีออกจากตำแหน่งที่ฝังเอาไว้ตอนต้น แช่สำลีใน 10 mg% Heparinized saline ปริมาตร 5 มล./สำลี 1 ชิ้น แช่ไว้นานประมาณ 10 นาที จึงบีบสำลีให้แห้งแล้วนำ specimens ที่ได้นี้ไปนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยใช้



รูปที่ 7 ภาพแสดงตำแหน่งที่ฝังสำลี บริเวณหน้าท้องของหนูขาว (×)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

hemacytometer ชนิด "Bright-Line" Counting Chamber เป็นเครื่องมือที่ใช้นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว

9. ในกรณีจะทดสอบฤทธิ์ของยาหรือสารอื่นๆว่ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการอักเสบหรือไม่นั้น จะให้ยาหรือสารนั้นๆแก่หนูทางปากก่อนทำการฝังสำลี ประมาณ 1 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Exudative model of inflammation (Cotton pellet implantation)

ฆ่าหนู ผ่าตัดเอาสำลีออกแล้วแช่ใน

10 mg% heparinizel saline(5มล./ชิ้น)

นาน 10 นาที

บีบสำลีให้แห้งและนำ specimen ที่ได้ไปนับจำนวน

เซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ Hemacytometer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่อักเสบด้วยการฝังสำลี (Exadutive model of inflammation, cotton pellet implantation) และวิธีทดสอบฤทธิ์ของยาต้านการอักเสบ และสารสกัดอัลคาลอยด์ตาเสือทุ่ง

วิธีการศึกษาทำตามแผนภูมิในรูป โดยแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม ให้ยาทางปากโดยใช้ syring feeding การให้ยาและสารแขวนลอยต่างๆแก่หนูแต่ละกลุ่ม จะให้ 1 ชม. ก่อนทำการฝังสำลี ปริมาตรของสารหรือยาที่จะให้ไม่เกิน 10 มล./นน.ตัว 1 กก. แบ่งกลุ่มต่างๆได้ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 4 กลุ่มๆละ 6 ตัว

- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Prednisolone ขนาด 5 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Indomethacin ขนาด 5 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Ibuprofen ขนาด 10 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ 1% methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 5 กลุ่มๆละ 6 ตัว

- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 6 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 9 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 15 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 22 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ 1% methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม

วิธีการนับเซลล์เม็ดเลือดขาว

ดัดแปลงจากวิธีการนับเซลล์เม็ดเลือดขาว (white cell count) ในคนจากวิธีการของกนกนาถ ชูปัญญา 2525 ซึ่งการนับจำนวนเม็ดเลือดขาว ปัจจุบันมีได้ 2 วิธี คือ

ก. Manual method หรือ Microscope method หรืออาจเรียกว่า counting chamber method หรือ hemocytometer method

ข. automatic method หรือ eletronic method

ซึ่งในการศึกษานี้ใช้วิธี microscopic method ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัดและสามารถทำได้ด้วยตัวเอง

วิธีทำ

- ใช้ปิเปตต์ชนิดที่ใช้สำหรับเจือจางเม็ดเลือดขาว (ตามรูปที่ 13) ดูด specimen ถึงขีด 0.5

- ดูด Heparinized saline จนถึงขีด 11 ทั้งหมดรวมเป็น 1 มล.

- เขย่าด้วยมืออย่างน้อย 2 นาที

- ค่อยๆปล่อยน้ำยา 2-3 หยดจากปลายปิเปตต์ทิ้ง (เป็นส่วนที่ specimen ไม่สัมผัสกับ heparinized saline ที่ดูดตามทีหลัง)

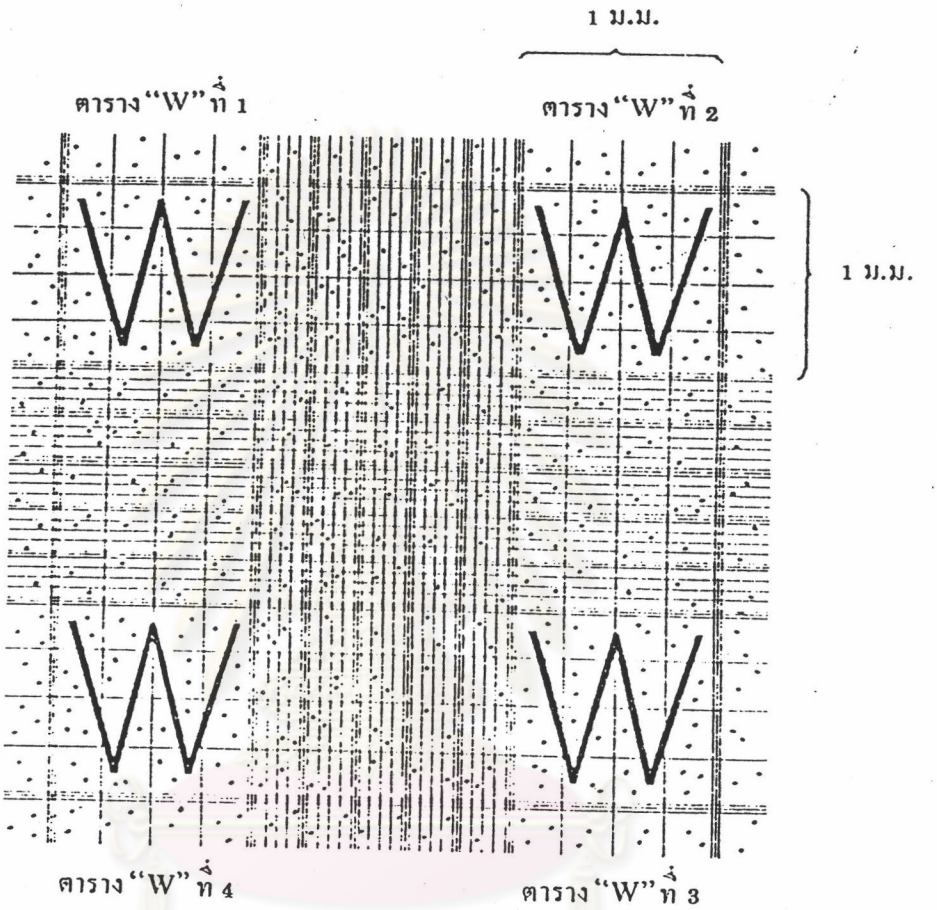
- ปล่อยน้ำยาเข้าไปบรรจุใน chamber ข้างละ 1 หยดทั้ง 2 ข้าง (Chamber ปิดด้วย coverglass อย่างถูกต้องตรงตำแหน่ง และวางไว้บนพื้นราบตรง) โดยแต่ละหยดที่บรรจุใน chamber แต่ละข้างต้องพอเหมาะ

ขั้นตอนการนับเซลล์ (ดูจากรูป 9-12)

นำ counting chamber ที่ใส่ specimen แล้วนำไปส่องดูด้วย microscope โดยใช้ objective lens ที่กำลังขยายต่ำ (ซึ่งมีกำลังขยาย 10x) เพื่อดูการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวว่ามีการกระจายตัวดีหรือไม่ ถ้ากระจายตัวไม่ดี จะมองเห็นเซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน ต้องเตรียมใหม่ จากนั้นทำการเปลี่ยน objective lens เป็นกำลังขยายที่สูงขึ้น คือ 40x ปรับโฟกัสและตำแหน่งที่จะนับให้ชัดเจนและพอดี แล้วจึงเริ่มนับเซลล์เม็ดเลือดขาวในช่วงที่ใช้นับเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังแสดงในรูป ซึ่งก็คือนับในบริเวณ w รวม 4 บริเวณ

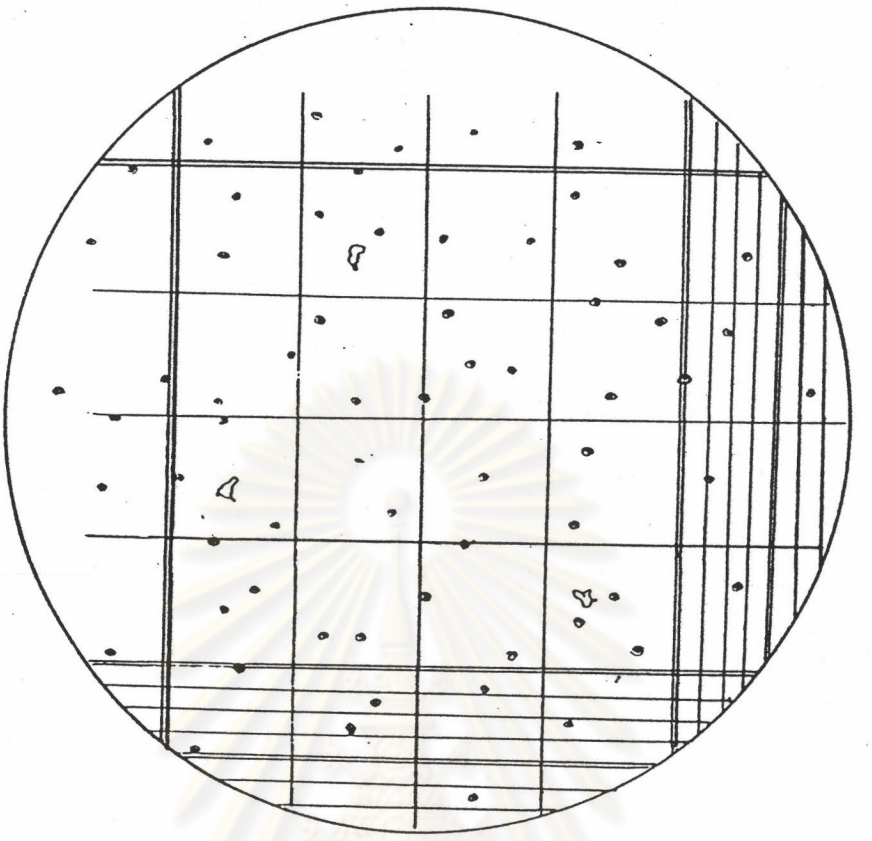
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I๑๖๒๘๐๒๑๗

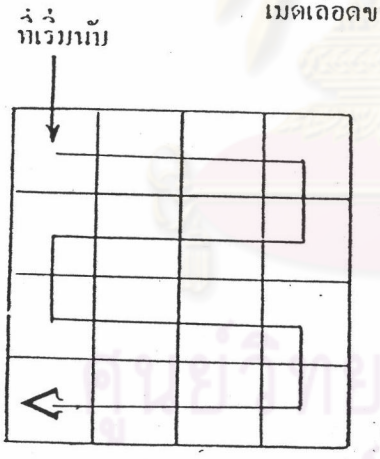


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 แสดงบริเวณที่ใช้นับเซลล์เม็ดเลือดขาวใน chamber (บริเวณ ผ) 4บริเวณที่ใช้ในการนับเซลล์เม็ดเลือดขาว (ตารางละ 1 ตร.มม.) ที่เห็นจุดดำๆ คือเม็ดเลือดขาวกระจายทั่วไป และสม่ำเสมอดี



เม็ดเลือดขาวใน 1 บริเวณ "W"

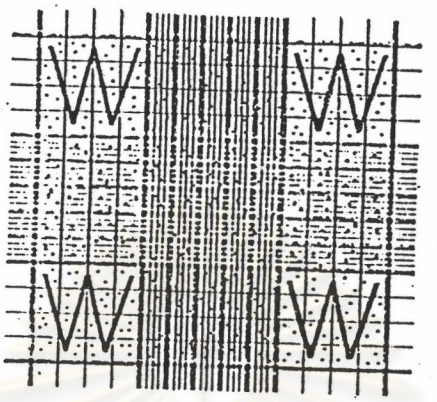


2	3	2	2
2	2	4	3
3	2	1	2
3	2	3	3

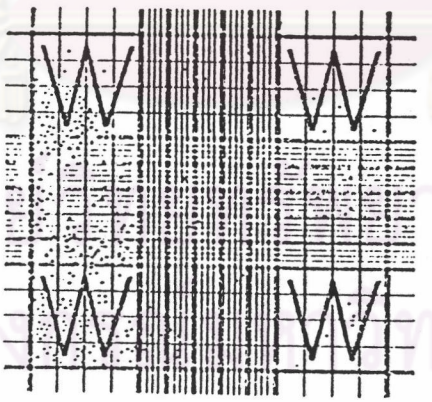
เริ่มนับที่มุมบนซ้าย
แล้วนับเรื่อยมาตามลูกศร

ใน 1 บริเวณ "W" มี 16 ตารางเล็ก

รูปที่ 10 แสดงวิธีการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวในบริเวณ "W" ที่ 1



รูปที่ 11 แสดงการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการกระจายดีถ้าเจย่าเพียงพอ และบรรจุ chamber ได้พอเหมาะ



รูปที่ 12 แสดงการกระจายของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่สม่ำเสมอ แสดงว่ามีการเจย่าไม่เพียงพอ และบรรจุลงใน chamber ไม่ดีพอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการเลือกนับเซลล์ ควรมีกฎเกณฑ์ไว้ให้แน่นอนเฉพาะของตนเอง ว่าจะนับเม็ดเลือดที่คร่อมเฉพาะเส้นด้านบน และด้านซ้ายของแต่ละช่วง และจะไม่นับเม็ดเลือดที่คร่อมเส้นด้านล่างและด้านขวา มิฉะนั้นจะเกิดการสับสนทำให้นับซ้ำหรือลืมนับ ค่าที่ได้จะผิดพลาดจากค่าจริงไป

การคำนวณ

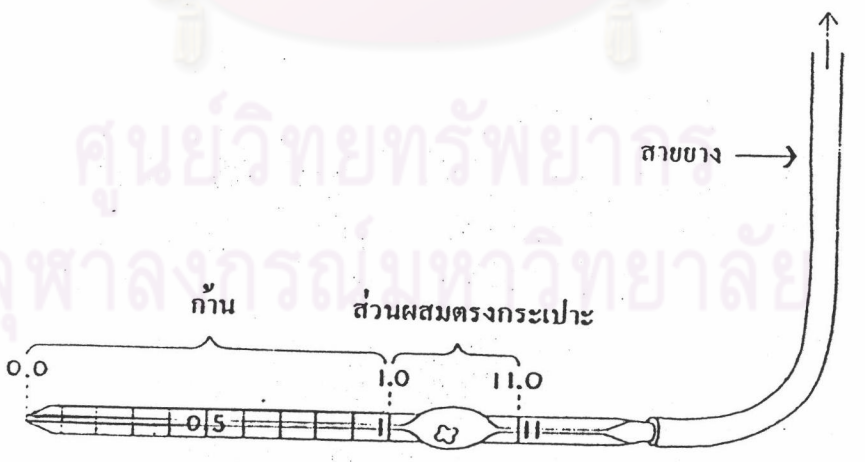
จากการดูดเลือด (specimen) ถึงขีด 0.5 และดูด heparinized saline จนถึงขีด 11 จะเห็นว่า specimen จำนวน 0.5 ส่วนจะถูกเจือจางโดย heparinized saline ให้เป็น 10 ส่วน ส่วนน้ำยา (heparinized saline) ที่อยู่เฉพาะในก้านปิเปตต์ไม่ได้มีส่วนมาสัมผัสกับ specimen (ในรูปที่ 13)

ดังนั้น specimen 0.5 ส่วนจึงถูกเจือจางในน้ำยาให้เป็น 10 ส่วน

ถ้า specimen 1 ส่วนจะถูกเจือจางในน้ำยาให้เป็น (10x1)/0.5

= 20 ส่วน

การเจือจางเป็น 1 : 20



รูปที่ 13 ปิเปตต์สำหรับเจือจางเม็ดเลือดขาวต่อกับสายยาง

บริเวณ W กว้าง 1 มม. ยาว 1 มม. ลึก 0.1 มม.

ในแต่ละบริเวณ W ที่นับปริมาตร	= 1x1x0.1	ลบ.มม.
	= 0.1	ลบ.มม.
ถ้านับ 4 บริเวณ	= 4x0.1	ลบ.มม.
ปริมาตรรวมทั้งหมด	= 0.4	ลบ.มม.

เมื่อทำการคำนวณปริมาตรเม็ดเลือดขาวจะมีวิธีการ คือ

ปริมาตร 0.4 ลบ.มม.	นับเม็ดเลือดขาวได้ X	เซลล์
,, 1 ,,	,, X / 0.4 = 2.5X	เซลล์

specimen ที่นับมีปริมาตร 5 มล. $= 5 \times 10^3$ ลบ.มม.

เจือจาง specimen เป็น 1: 20

ดังนั้น	1 ลบ.มม. นับเซลล์ได้	= 2.5X x 20 = 50X	เซลล์
	5 ,, ,,	= 50X x 5 x 10^3	เซลล์
		= X x 250 x 10^3	เซลล์

การคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (% inhibition) คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{WBC ที่นับได้ในกลุ่มควบคุม} - \text{WBC ที่นับได้ในกลุ่มที่ได้ยา}}{\text{WBC ที่นับได้ในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยา โดยใช้หลักทางสถิติคือ "Analysis of Variance" เมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรตาเสือทุ่ง ต่อการยับยั้งการเกิด granuloma ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยวิธีการฝังสำลี เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ

ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาการอักเสบเรื้อรัง โดยการทำให้เกิด granuloma ด้วยการฝังสำลี (cotton pellet induced granuloma formation) ที่ชั้น subcutaneous ตามวิธีการของ Freeman, Mangan and Watkin(1979) ; Swing and Shideman(1972) มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัว เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณยาที่จะให้

2. เตรียมสำลีปลอดเชื้อ (sterile cotton) น้ำหนัก 40 $\pm$ 1 มก./ชิ้น

3. แช่เครื่องมือผ่าตัดและด้ายเย็บแผล ในแอลกอฮอล์ 70% นานประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคก่อนนำมาใช้

4. เมื่อทำการผ่าตัดฝังสำลีจะทำให้หนูสลบด้วย ether ตลอดเวลาที่ทำการผ่าตัดฝังสำลี และเย็บแผล

5. เช็ดผิวหนังบริเวณกลางหน้าท้องก่อนทำการผ่าตัดด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน การผ่าตัดจะตัดลึกถึงชั้นใต้ผิวหนัง แผลยาวประมาณ 1.5 ซม. จากนั้นจะฝังสำลี 1 ชิ้นต่อหนู 1 ตัว

6. เย็บปิดแผลด้วยด้ายสีดำ แบบ interruptel suture ประมาณ 2-3 stiches นับเป็นวันที่ 1 ของการฝังสำลี

7. หลังจากนั้นเลี้ยงหนูตามปกติเป็นเวลา 5 วัน จึงทำการฆ่าหนูด้วยอีเธอร์ และนำสำลีเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้น้ำในสำลีระเหยออกไปจนสำลีแห้ง

8. เมื่อครบกำหนด จึงนำสำลีแยกออกมาจากตู้ควบคุมอุณหภูมิ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำสำลีมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของ granuloma

9. ในกรณีจะทดสอบฤทธิ์ของยาหรือสารอื่นๆว่ามีผลต่อการสร้าง granuloma หรือไม่นั้นจะให้ยาหรือสารนั้นๆก่อนทำการฝังสำลี ประมาณ 1 ชั่วโมง การให้ยาหรือสารต่างๆจะให้วันละ 1 ครั้งทางปาก ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน จึงทำการฆ่าหนูแล้วนำสำลีออกมาชั่งหาน้ำหนักของ granuloma ต่อไปได้ตามวิธีการข้างต้น

วิธีการศึกษาทำตามแผนภูมิในรูป โดยแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม ให้ยาทางปากโดยใช้ syring feeding การให้ยาและสารแขวนตะกอนแต่ละชนิดจะให้วันละ 1 ครั้งติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ปริมาตรที่ให้ไม่เกิน 10 มล./นน.ตัว 1 กก.

<u>กลุ่มที่ 1</u> แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 4 กลุ่มๆละ 6 ตัว

- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Prednisolone ขนาด 5 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Indomethacin ขนาด 2.5 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ Ibuprofen ขนาด 10 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ 1% methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม

<u>กลุ่มที่ 2</u> แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 6 กลุ่มๆละ 6 ตัว

- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 6 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 9 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 15 มก./กก.
- ได้รับสารสกัดจากตาเสือทุ่งขนาด 22 มก./กก.
- ได้รับยาแขวนตะกอนของ 1% methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cotton pellet-induced granuloma formation

เก็บสำลีในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

↓

นำสำลีออกมาชั่งน้ำหนัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่14 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำให้เกิดการสร้าง granuloma ด้วยการฝังสำลี (Cotton pellet-induced granuloma formation) และวิธีทดสอบฤทธิ์ของยาต้านการอักเสบ และสารสกัดอัลคาลอยด์ตาเสือทุ่ง

การคำนวณหาเปอร์เซนต์ยับยั้งการเกิด granuloma (% inhibition)

น้ำหนักของ granuloma = น้ำหนักสำลีที่ใช้ฝังแล้วเป็นเวลา 5 วันและระเหยน้ำออกจากสำลีจนสำลีแห้งแล้ว − น้ำหนักสำลีก่อนฝังที่หน้าท้อง

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{นน.granulomaในกลุ่มควบคุม} - \text{นน.granulomaในกลุ่มที่ได้ยา}}{\text{นน.granuloma ในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยา โดยใช้หลักทางสถิติ คือ "Analysis of Variance" เมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ขั้นตอนที่ 4 เป็นการศึกษาความเจ็บปวดชนิดเฉียบพลัน (Acute pain) โดยใช้ model Abdominal Constriction (Writhing test) ตามวิธีการของ Koster, Anderson and De Beer, 1959 ; Deraedt, Vander and Margolin, 1956 ; Deraedt et al.,1980 โดยการฉีดสารละลาย 1% aqueous solution of acetic acid เข้าที่ช่องท้องของหนูขาว (intraperiteneal) เพื่อชักนำให้เกิดความเจ็บปวด มีขั้นตอนในการทดลองดังนี้

1.เตรียมหนูที่จะทดลอง โดยงดอาหารหนูให้กินแต่น้ำได้เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชม.ก่อนทำการทดลอง เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารไปรบกวน bioavailability ของยา

2. หากล่องกระจกขนาดพอเหมาะที่จะดูพฤติกรรมของหนู เพื่อนับจำนวน writhing

3. ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัว เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณยาที่จะให้

4. ฉีด Acetic acid ตามขนาด 1 ml/100 gms เข้าทางช่องท้องหนูขาว (interperitoneal)

5. วางหนูที่ฉีด acetic acid แล้วในกล่องที่เตรียม แล้วนับจำนวน writhing ทันทีเป็นเวลานาน 15 นาที

6. กรณีจะทำการทดสอบยาหรือสารอื่นๆว่ามีผลต่อความเจ็บปวดหรือไม่นั้น จะทำการให้ยาหรือสารนั้นๆก่อนฉีด aqueous solution of acetic acid เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยให้ทางปาก ปริมาตรไม่เกิน 10 มล./นน.ตัว 1 กก. แล้วจึงทำการฉีด Acetic acid เมื่อครบกำหนดเวลาที่ให้

วิธีการศึกษาทำตามแผนภูมิ โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 6 ตัว โดยให้ยาเข้าทางปาก โดยวิธีใช้ feeding syring ดังนี้คือ

กลุ่มแรก ได้รับสารแขวนตะกอน 1% methyl cellulose

กลุ่มที่ 2 ได้รับยาแขวนตะกอน Indomethacin ขนาด 5 มก./กก.

กลุ่มที่ 3 ได้รับยาแขวนตะกอนตาเสือทุ่งขนาด 22 มก./กก.

กลุ่มที่ 4 ได้รับยาแขวนตะกอนตาเสือทุ่งขนาด 30 มก./กก.

กลุ่มที่ 5 ได้รับยาแขวนตะกอนตาเสือทุ่งขนาด 40 มก./กก.

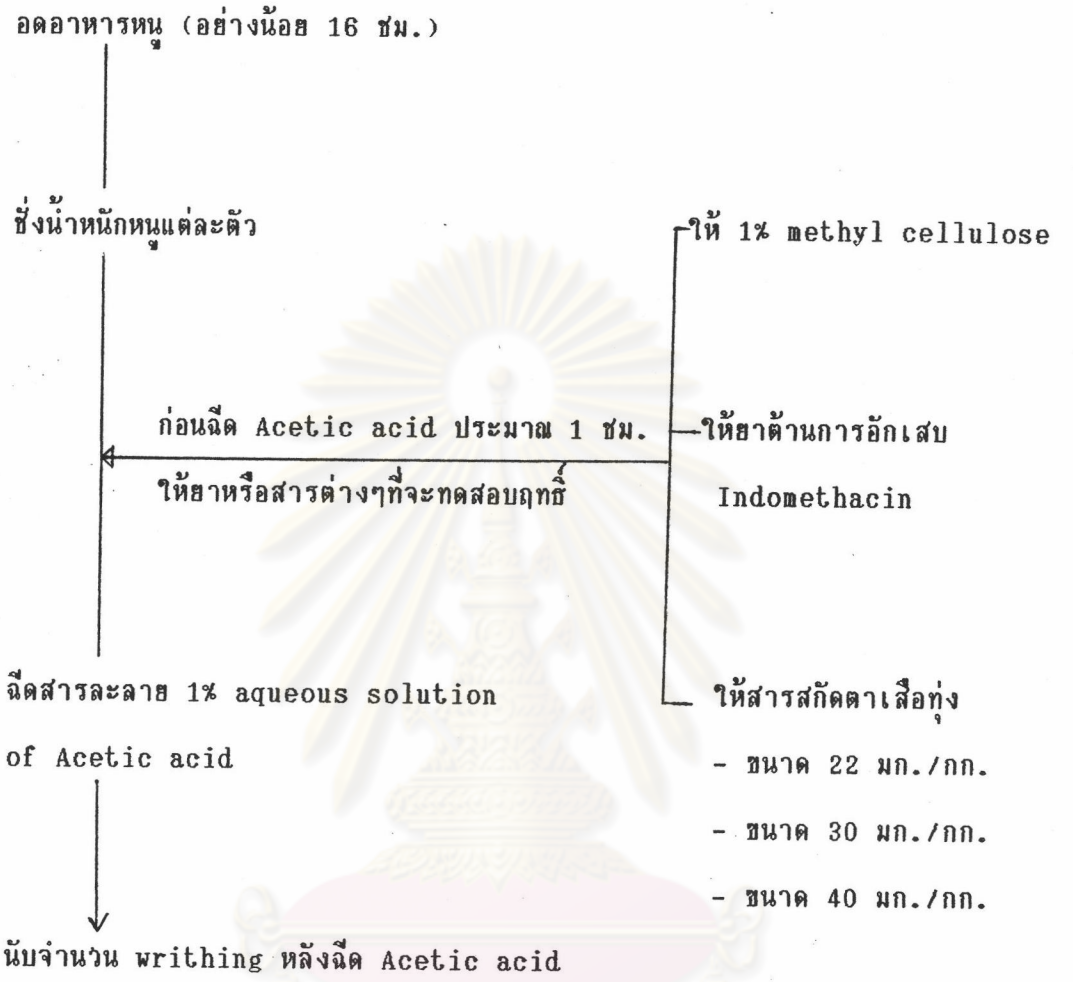
การคำนวณหาเปอร์เซนต์ยับยั้งอาการปวด (% inhibition) คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวน writhing ในกลุ่มที่ treated}}{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวน writhing ในกลุ่มควบคุม}}\right) \times 100$$

ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยา โดยใช้หลักทางสถิติ คือ "Analysis of Variance" เมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Model of Abdominal Constriction test (Writhing test)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 แผนภูมิแสดงขั้นตอนทำให้เกิดอาการเจ็บปวด (Abdominal constriction test) และวิธีการทดสอบฤทธิ์แก้ปวดของยาต้านการอักเสบและสารอัลคาลอยด์ตาเสือทุ่ง