บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา Ustilaginoidea virens (Ck.) Tak.

เก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคดอกกระถินจากจังหวัดเชียงราย อยุธยา และพัทลุง เพื่อนำมาแยกเอาเชื้อรา Ustilaginoidea virens และนำมาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (albino rat) ตัวผู้ซึ่งมีน้ำหนัก 250 - 300 กรัม และมีอายุระหว่าง 3 - 6 เดือน เลี้ยงในกรงสัตว์ทดลองคณะเภสัชศาสตร์ ให้อาหารและน้ำตามต้องการ

เคมีภัณฑ์

Clorox 10%

อาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่

-potato dextrose agar

-potato dextrose broth

Urethane (ethyl carbamate)

Sodium Heparin (Heparin Injection, Leo Pharm.)

Normal saline solution (0.85% NaCl)

Standard Potassium Solution

Acetylcholine Chloride

Adrenaline (Epinephrine) Injection (โรงงานเภสัชกรรมทหาร)

Propranolol HCl (Inderal Injection, Winthrop.)

Phentolamine

Nor epinephrine bitartrate (Levophed Injection, Winthrop.)

Tridistrilled water

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตู้สำหรับเพาะ และเตรียมเชื้อรา

ภาชนะที่ใช้ในการเพาะ และเก็บเชื้อรา

Centrifuge

Shaker

Hot air oven

Magnetic stirer

Dialysis tubing (DL 620 pore size 19 nm.)

Four channel recorder (Devices Co. Mx 4 type)

Physiological Pressure Transducers (Bell & Howell Limited)

Flame Photometer (Perkin Elmer Model 51 Ca)

อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น

วิธีดำเนินการทดลอง

วิธีดำเนินการทดลองแบ่งเป็น 2 ภาค คือ

ภาคที่ 1. การเตรียมเชื้อรา Ustilaginoidea virens (Ck.) Tak.

1. เตรียมจากเชื้อราที่เพาะขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นการนำเมล็ดข้าวเป็นโรคดอกกระถินมาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Isolation) แล้วนำเชื้อราที่แยก

ได้ (Pure culture) มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกประเภทของอาหารและวิธีการให้เหมาะสม เพื่อให้ได้เชื้อราปริมาณมากพอที่จะนำไปสกัด และเตรียมเพื่อทดลองกับหนูขาว

2. เตรียมจากเชื้อราที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งได้จากเมล็ดข้าวที่เป็นโรคดอกกระถิน

ภาคที่ 2. การทดลองในหนูขาว

ทดลองโดยการฉีดสารที่เตรียมจากเชื้อรา หรือสารที่ใช้ทดสอบเข้าทางเส้นโลหิตดำ และบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

ภาคที่ 1.

การเตรียมเชื้อรา Ustilaginoidea virens (Ck.) Tak.

ทุกขั้นตอนในการเตรียมเชื้อราทำภายใต้สภาพที่ปราศจากเชื้ออื่น (Aseptic condition) โดยเตรียมในตู้ที่ปราศจากเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อได้แก่ Potato dextrose agar (PDA) ซึ่งเป็นอาหารแข็ง และ Potato dextrose broth ซึ่งเป็นอาหารเหลว อาหารทั้งสองชนิดนี้เตรียมดังสูตรต่อไปนี้

Potato dextrose agar

potato	200	gm.
dextrose	20	gm.
agar	17	gm.
distrilled water to make	1000	ml.

Potato dextrose broth

potato	200	gm.
dextrose	20	gm.
distrill water to make	1000	ml.

นำอาหารแข็ง (PDA) ที่เตรียมเสร็จแล้วบรรจุในหลอดทดลองขนาดความจุ 20 มล. หลอดละ 8 มล. และบรรจุใน Erlenmeyer flask เพื่อเตรียมไว้เทใส่จานเลี้ยงเชื้อ อาหารเหลว (potato dextrose broth) ที่เตรียมเสร็จแล้วบรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาดความจุ 500 มล. ขวดละ 180 มล. นำอาหารเหลวนี้ไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องอบไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เมื่อนึ่งเสร็จแล้วนำหลอดทดลองที่บรรจุ PDA มาตั้งให้เอียงประมาณ 45° องศา (ทำ agar slant) ส่วน PDA ที่อยู่ใน flask นำมาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อซึ่งได้ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180° C มาแล้วเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เท PDA จานละ 20 มล. ซึ่งต้องรีบทำในขณะที่อาหารยังอุ่นอยู่แล้วจึงปล่อยให้เย็นลงเพื่อให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

2. <u>การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์</u> (Isolation)

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ทำโดยแยกเอาส่วนสีขาวตรงกลางเมล็ดข้าวที่เป็นโรคดอกกระถิน ซึ่งเป็นส่วนของเส้นใย (mycelium) ของเชื้อรา <u>Ustilaginoidea virens</u>(2),(6) โดยการแกะเปลือกของเมล็ดข้าวออกให้เหลือแต่ส่วนที่เป็น spore ball แล้วใช้ใบมีดตัดสปอร์ที่ผิวออกจนเหลือแต่เส้นใยสีขาวที่อยู่ภายใน ตัดส่วนเส้นใยนี้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2 x 2 มม. แล้วนำไปล้างใน sterile water โดยเปลี่ยนน้ำ 2 - 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาแช่ใน Clorox 10% เป็นเวลา 2 นาที เพื่อฆ่าเชื้ออื่นที่อาจติดมากับผิวภายนอก ล้างใน sterile water อีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงใช้เข็มย้ายเชื้อ ย้ายเอาเส้นใยไปวางบน PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยวางตรงกลางจาน จานละ 1 ชิ้น เก็บจานนี้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วคอยสังเกตดูการงอกของเชื้อรา ซึ่งจะเห็นเป็น

เส้นใยสีขาวเจริญออกมาจากชิ้นส่วนที่วางไว้ การงอกของเชื้อรานี้จะใช้เวลาประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ จากนั้นจะใช้เข็มย้ายเชื้อเชื่อเส้นใยที่งอกใหม่นี้ไปเลี้ยงบน PDA ในหลอดทดลอง เพื่อเก็บไว้เพาะเชื้อราครั้งต่อไป

3. การเพาะเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้เข็มย้ายเชื้อที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเส้นใยของเชื้อรา Ustilaginoidea virens ที่เลี้ยงเก็บไว้ในหลอดทดลอง มาแยกเพาะใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้

3.1 เลี้ยงบน Potato dextrose agar ในจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

3.2 เลี้ยงบน Potato dextrose agar ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้อง

3.3 เลี้ยงใน Potato dextrose broth ใน flask ที่อุณหภูมิห้อง

3.4 เลี้ยงใน Potato dextrose broth ใน flask แล้วนำ flask ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวนอน (horizontal shaker) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ออกซิเจนถ่ายเทไปทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงนำมาตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องต่อไปอีก 7 สัปดาห์

จากการสังเกตดูการเจริญของเชื้อราในอาหารแต่ละชนิด โดยใช้เวลาในการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ได้พบว่าการเพาะบนอาหารแข็ง (PDA) ในหลอดทดลองจะให้ผลดีกว่าการเพาะในจานเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเพาะในจานเลี้ยงเชื้อบางจานจะพบมีเชื้อราอื่นขึ้นปนมาบ้าง (Contamination) สำหรับการเพาะในอาหารเหลว (Potato dextrose broth) นั้น การเขย่า flask ก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะช่วยให้เชื้อรางอก และกระจายได้เร็ว โดยเชื้อราจะลอยขึ้นมาเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับ flask ที่ไม่ได้เขย่านั้น จะพบว่า ชิ้นส่วนของเชื้อราที่นำมาเพาะจะจมอยู่ที่ส่วนล่างของอาหารเหลว ทำให้เชื้อรางอกได้ช้ามากหรือไม่งอกเลย

การเพาะเชื้อราครั้งต่อ ๆ ไป เพื่อจะนำไปใช้ทดลองกับหนูขาวได้เพาะให้มีปริมาณมากโดยเลี้ยงในอาหารแข็ง (PDA) และในอาหารเหลว (Potato

dextrose broth) เป็นเวลาประมาณ 6 - 8 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ PDA ที่บรรจุในหลอดทดลอง จำนวนครั้งละ 300 - 400 หลอด และ Potato dextrose broth ครั้งละ 24 - 30 flask โดยเขย่า flask หลังจากที่ได้ถ่ายเชื้อราใส่ลงไปแล้วเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ดังกล่าวข้างต้น

เชื้อราที่เลี้ยงบน PDA นั้นจะมีเส้นใยที่เจริญออกมาตอนแรกสีขาวฟู ต่อมาเส้นใยที่อยู่ตรงกลางจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือเหลืองปนเขียว เมื่อทิ้งไว้จะมีการสร้างสปอร์ ส่วนเชื้อราที่เลี้ยงใน Potato dextrose broth จะเจริญเป็นกลุ่มเส้นใยสีขาวฟู ซึ่งระยะแรกจะลอยอยู่บริเวณผิวของอาหารเหลว ต่อมาจะมีบางส่วนจมลงไปเจริญอยู่ในอาหารเหลว เมื่อทิ้งไว้เชื้อราจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีขาวอมเหลือง

4. <u>การสกัดเชื้อราเพื่อเตรียมไปใช้ทดลองกับหนูขาว</u>

4.1 การย้ายเชื้อราจากอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน sterile water

เตรียม sterile water โดยใช้ flask ขนาดความจุ 500 มล. บรรจุน้ำกลั่น 3 ครั้ง 200 มล. แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที กระดาษกรองและอุปกรณ์ที่ใช้ในการกรองหุ้มด้วยแผ่นอาลูมิเนียม (aluminum foil) และนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.1.1 ใช้เข็มย้ายเชื้อเชี่ยแต่เฉพาะส่วนเส้นใย (mycelium) ของเชื้อราที่เพาะบน PDA ในหลอดทดลอง มาใส่ใน sterile water โดยใช้เชื้อรา ประมาณ 100 หลอด ต่อ sterile water 1 flask เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวนอน เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ส่วนที่ผ่านกระดาษกรอง (filtrate) เก็บไว้ใน sterile flask และให้ชื่อว่า "<u>ส่วน T</u>" ส่วนเส้นใยของเชื้อราบนกระดาษกรองนำไปอบหาน้ำหนักเชื้อราแห้ง (ดูข้อ 4.2)

4.1.2 นำเชื้อราที่เพาะใน Potato dextrose broth มากรองด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกเส้นใยออกจากอาหารเหลว และเก็บอาหารเหลวที่ผ่านกระดาษกรองไว้ใน sterile flask และให้ชื่อว่า "<u>ส่วน B</u>" ส่วนเส้นใยของเชื้อราที่อยู่บนกระดาษ

กรองได้ย้ายมาใส่ใน sterile water โดยใช้เชื้อราที่เพาะไว้ 8 flask ต่อ sterile water 1 flask เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวนอนเป็นเวลา 10 วัน กรองด้วยกระดาษกรอง ส่วนที่ผ่านกระดาษกรองเก็บไว้ใน sterile flask และให้ชื่อว่า "ส่วน M" ส่วนเส้นใยของเชื้อราบนกระดาษกรองนั้นนำไปอบหาน้ำหนักเชื้อราแห้ง (ดูข้อ 4.2)

4.2 การเตรียมสิ่งสกัด (extracts) จากเชื้อราให้มีความเข้มข้นเป็น 10% ของน้ำหนักเชื้อราแห้ง

การหาน้ำหนักของเชื้อราในข้อ 4.1.1 และข้อ 4.1.2 ทำโดยนำเชื้อรา พร้อมทั้งกระดาษกรองไปอบให้แห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 75° C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ชั่งคำนวณหาน้ำหนักแห้งของเชื้อรา แล้วจึงนำน้ำที่สกัดได้จากเชื้อรา ซึ่งได้แก่ ส่วนT ส่วน B และส่วน M มาจัดปริมาตรให้ได้เป็น 10 เท่าของน้ำหนักของเชื้อราแห้ง โดยการอุ่นน้ำให้ระเหยออกจากสิ่งสกัดให้เหลือปริมาตรตามที่คำนวณไว้จากน้ำหนักของเชื้อราแห้ง ควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 70°C ก็จะได้สิ่งสกัดซึ่งมีความเข้มข้นสมมูลย์กับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราในน้ำ

บรรจุสิ่งสกัดที่เตรียมได้ไว้ใน sterile flask เก็บในตู้เย็นซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 18°C เมื่อจะนำไปทดลองกับหนูขาวจะแบ่งใส่ screw cap test tube ซึ่งต้องลนไฟฆ่าเชื้อทุกครั้งที่เปิดและปิด flask

5. การเตรียมสิ่งสกัด (extract) จากเมล็ดข้าวที่เป็นโรคดอกกระถิน

นำเมล็ดข้าวที่เป็นโรคดอกกระถินมาแกะส่วนเปลือกทิ้ง บ่นให้ละเอียด แล้วอบให้แห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วจึงชั่งหาน้ำหนักแห้ง สกัดโดยวิธีต้มเดือด (decoction) เป็นเวลา 5 นาที ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักของเมล็ดข้าวที่เป็นโรค ต่อปริมาตรของสิ่งสกัด) และให้ชื่อว่า "ส่วน S"

ภาคที่ 2

การทดลองในหนูขาว

การทดลองในหนูขาวได้แบ่งหนูขาวออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว น้ำหนักเฉลี่ยของหนูเท่ากับ 271.01 ± 32.43 กรัม

สิ่งสกัด (extract) จากเชื้อรา Ustilaginoidea virens ที่ได้จากการเตรียมในภาคที่หนึ่ง และนำมาใช้ในการทดลองมี 4 ชนิด โดยสรุปดังนี้

ส่วนT คือสิ่งที่สกัดได้จากเส้นใยของเชื้อราที่เพาะขึ้นบนอาหารแข็ง

ส่วนB คือ ส่วนของอาหารเหลวที่เพาะเชื้อราไว้นาน 8 สัปดาห์ และได้แยกส่วนเส้นใยของเชื้อราออกไปแล้ว

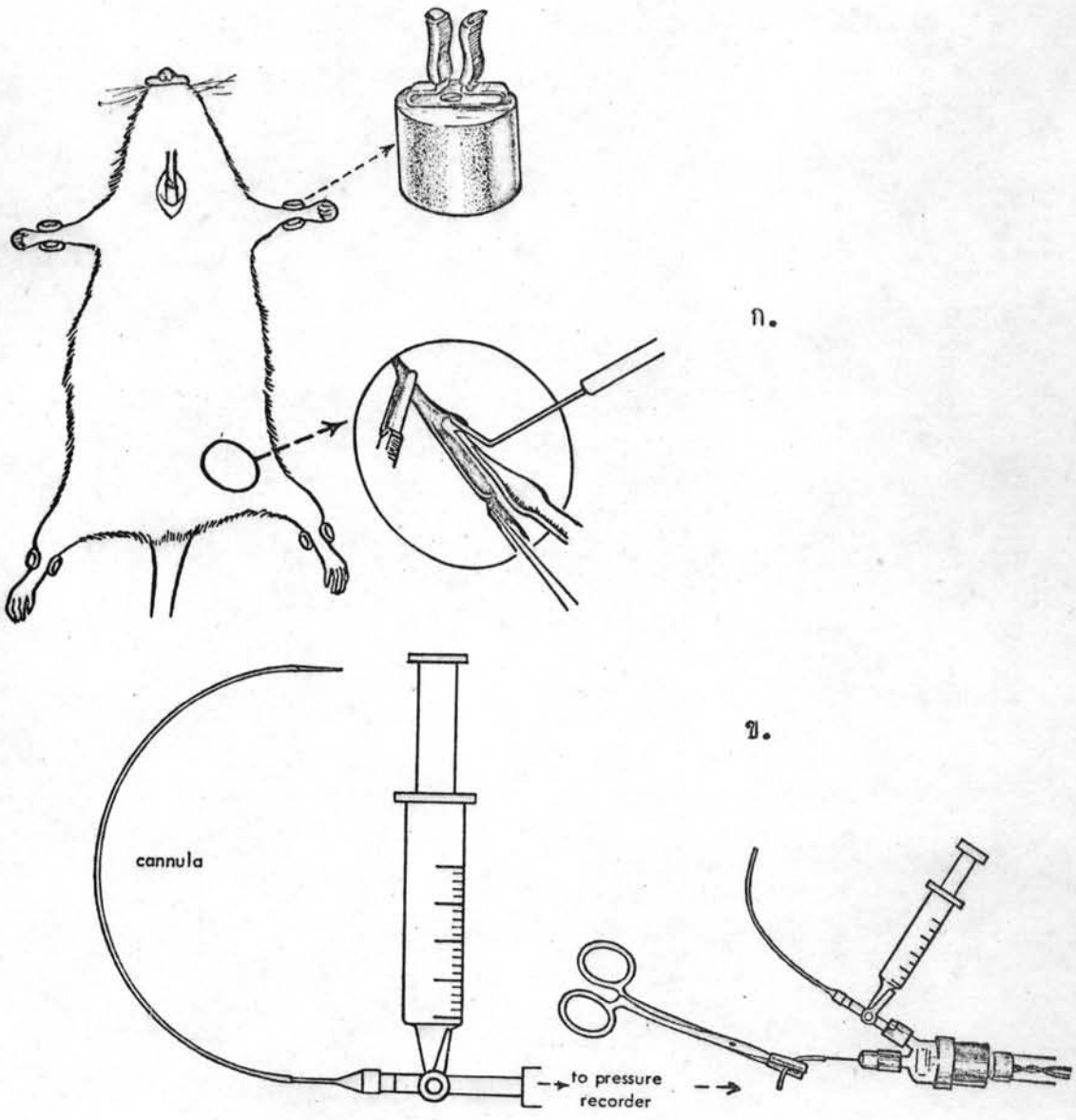
ส่วนM คือ สิ่งที่สกัดได้จากเส้นใยของเชื้อราที่เพาะขึ้นในอาหารเหลว (Potato dextrose broth)

ส่วนS คือ สิ่งที่สกัดได้จากเมล็ดข้าวที่เป็นโรคดอกกระถิน

1. เตรียมสัตว์ทดลอง

1.1 การทำหนูให้สลบ (anesthesia) ทำโดยการฉีด Urethane 25% (W/V solution in water) ในขนาด 780 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม ของน้ำหนักตัวหนูขาว[20] ควบคุมอุณหภูมิรอบ ๆ ตัวหนูให้ได้ประมาณ 38° C

1.2 Cannulation of the trachea เมื่อหนูหมดความรู้สึก จับหนูนอนหงายดังรูปที่ 1 ก.[20] ใช้ใบมีดกรีดผิวหนังบริเวณคอตามยาวของเส้นกลางลำตัวเป็นระยะทางประมาณ 1.5 ซม. ใช้ haemostatic forcep เปิดผิวหนังผ่านเนื้อเยื่อต่าง ๆ ลงไปจนถึงชั้นกล้ามเนื้อ เมื่อแยกกล้ามเนื้อออกจะพบหลอดลม ใช้ด้ายคล้องด้านล่างแล้วจึงเจาะหลอดลมให้ได้ขนาดพอสอดได้ด้วย tracheal cannula ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มม. เมื่อสอดแล้วจึงมัดด้ายที่คล้องไว้ให้แน่นดังรูปที่ 2 ก.[20] ในกรณีที่หลอดลมมีการอุดกันเนื่องจากมีสิ่งขับแยก (secretion) ก็ใช้ polyethylene tube ที่ขนาดเล็กกว่า cannula ต่อกับ syringe สอดเข้าไปในหลอดลมดูดสิ่งขับแยกออกมา

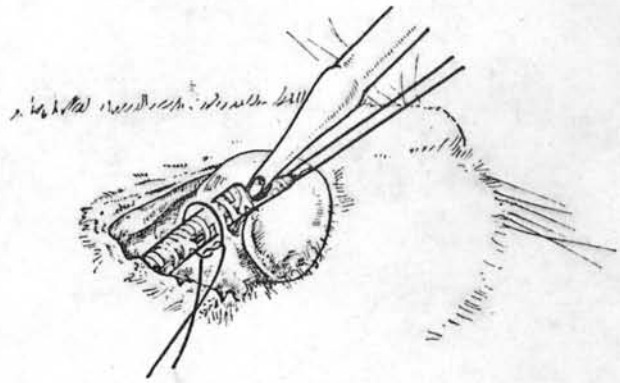


รูปที่ 1

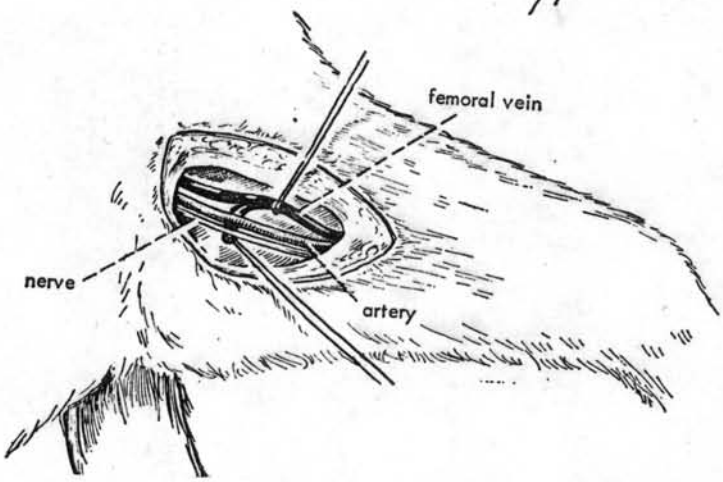
ก. แสดงตำแหน่งที่ทำ Tracheal cannulation และ Femoral vein (หรือ Femoral artery) cannulation ในหนูขาว

ข. แสดงการต่อเครื่องมือเพื่อบันทึกความดันโลหิต (arterial blood pressure)

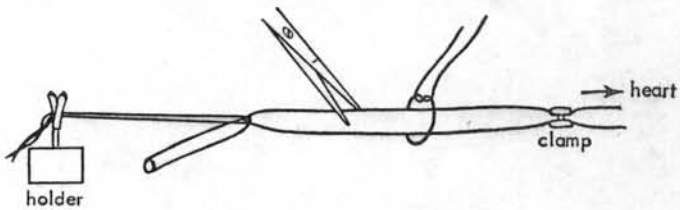
ก.



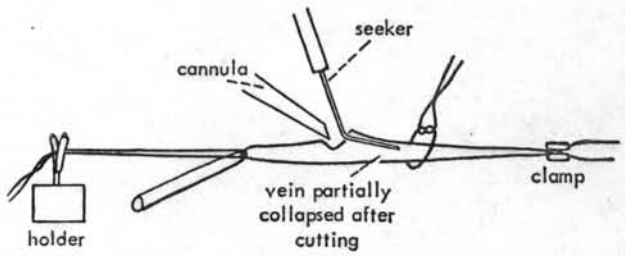
ข.



004252



ค.



รูปที่ 2

ก. แสดงการทำ Tracheal cannulation

ข. แสดงตำแหน่งของ Femoral vein และ Femoral artery

ค. แสดงการทำ Vein cannulation

1.3 Cannulation of the artery and vein การทดลองนี้จะให้ยาหนูขาวทาง femoral vein และวัดความดันโลหิตทาง femoral artery ซึ่งเส้นเลือดทั้งสองนี้จะอยู่คู่กันที่บริเวณโคนขาด้านใน ดังรูปที่ 2 ข.[20] ใช้ใบมีดกรีดผิวหนังยาวประมาณ 1 - 2 ซม. ใช้ haemostatic forcep แยกเนื้อเยื่อและไขมันที่อยู่ใต้ผิวหนังออกจะพบ femoral vein และ femoral artery อยู่คู่กัน แยกเส้นโลหิตทั้งสองนี้ด้วย forecep และใช้ด้ายคล้องไว้ femoral vein มีขนาดใหญ่กว่าและตีบ (collapse) ได้ง่าย จึงทำ cannulation ก่อน โดยใช้ polyethylene tube (I.D. .023", O.D. .038") ซึ่งปลายด้านที่สอดเข้าเส้นเลือดตัดให้เฉียงและเรียบ อีกปลายต่อกับ Three-way-stopcork และ syringe ซึ่งบรรจุด้วย heparinized saline (100 units/ml.) ดังรูปที่ 2 ค.[20] การทำ femoral artery cannulation ก็ทำวิธีเดียวกัน แต่ใช้ polyethylene tube ซึ่งต่อเข้ากับ Pressure Transducer ชนิด Strain guage โดยผ่าน Three-way-stopcork ดังรูปที่ 1 ข.[20]

1.4 การบันทึกความดันโลหิต ทำโดยผ่าน Pressure Transducer ซึ่งต่อเข้ากับช่องหนึ่งของเครื่องบันทึก ชนิด Four channal recorder ซึ่งจะบันทึกความดันโลหิต (palsatile pressure) ของหนูขาวไว้บนกระดาษกราฟ ซึ่งเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่

2. การศึกษาผลของการฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ (Intravenous Injection) ของสิ่งสกัด (extracts) จากเชื้อรา

โดยแบ่งหนูขาวเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว

กลุ่มที่ 1 ให้สิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T

กลุ่มที่ 2 ให้สิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน B

กลุ่มที่ 3 ให้สิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน M

กลุ่มที่ 4 ให้สิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน S

เริ่มให้ตั้งแต่ขนาด 0.05 มล. 0.10 มล. 0.15 มล. 0.20 มล. 0.25 มล. 0.30 มล. 0.35 มล. 0.40 มล. 0.45 มล. และ 0.50 มล. ตามลำดับ

บันทึกความดันโลหิตปกติของหนูขาวก่อนให้ยาทุกครั้ง และบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังให้ยา จากผลที่บันทึกได้ นำมาหาอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) ค่าความดันโลหิตโดยเฉลี่ย (mean arterial pressure) ของหนูขาวก่อนและหลังให้ยา และระยะเวลาการออกฤทธิ์ของยา โดยได้ถือค่าความดันเฉลี่ยโดยประมาณดังนี้

mean pressure

= diastolic pressure + 1/3(systolic pressure-diastolic pressure)

3. ศึกษาผลของการฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ (Intravenous Injection) ของ Normal saline solutionและ Potato dextrose broth

Normal saline solution (ให้ชื่อว่า NSS) และ Potato dextrose broth (ให้ชื่อว่า PDB) ใช้เป็นสารอ้างอิงฉีดให้กับหนูขาว เพื่อดูผลเปรียบเทียบกับผลของการฉีดเข้าเส้นโลหิตดำของสิ่งสกัด (extracts) จากเชื้อรา โดยทำการทดลองกับหนูขาว 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 5 และกลุ่มที่ 6 กลุ่มละ 8 ตัว

หนูกลุ่มที่ 5 ให้ NSS

หนูกลุ่มที่ 6 ให้ PDB

เริ่มให้ตั้งแต่ขนาด 0.05 มล. 0.10 มล. 0.15 มล. 0.20 มล. 0.25 มล. 0.30 มล. 0.35 มล. 0.40 มล. 0.45 มล. และ 0.50 มล. ตามลำดับ

บันทึกความดันโลหิตของหนูขาว ก่อนและหลังให้ยาทุกครั้ง เพื่อนำมาหาอัตราการเต้นของหัวใจ ความดันโลหิตของหนูขาวก่อนและหลังให้ยา และระยะเวลาการออกฤทธิ์ของยา

4. การหาปริมาณโปแตสเซี่ยมที่มีอยู่ในสิ่งสกัด (extracts) จากเชื้อรา

หาปริมาณโปแตสเซี่ยมที่มีอยู่ในสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วนT ส่วน B ส่วน M ส่วน S และ PDB (Potato dextrose broth) โดยใช้ Flame Photometer (Perkin Elmer Model 51 Ca) เนื่องจากอิออนบางชนิด เช่น โปแตสเซี่ยม โซเดี่ยม และแคลเซี่ยม มีผลต่อระบบการหมุนเวียนของโลหิต และในมันฝรั่งซึ่งใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา ก็มีปริมาณของโปแตสเซี่ยมค่อนข้างสูง[22] ดังนั้นสิ่งสกัดจากเชื้อราก็อาจมีโปแตสเซี่ยมอยู่ด้วย และผลที่เกิดขึ้นต่อความดันโลหิตเมื่อฉีดสิ่งสกัดจากเชื้อราอาจเป็นผลเนื่องมาจากโปแตสเซี่ยม ดังนั้นจึงควรที่จะได้หาปริมาณโปแตสเซี่ยมที่มีอยู่ เพื่อนำค่านี้ไปใช้ในการทดลองเพื่อดูผลจากโปแตสเซี่ยมต่อความดันโลหิตเปรียบเทียบกับผลที่เกิดจากเชื้อราต่อไป

5. ศึกษาผลของการฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ (Intravenous Injection) ของ Standard Potassium Solution ซึ่งมีปริมาณโปแตสเซี่ยมเท่ากับสิ่งสกัดจากเชื้อรา

5.1 เตรียม Standard Potassium Solution เมื่อทราบปริมาณโปแตสเซี่ยมที่มีอยู่ในสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วนT เตรียมสารละลายโปแตสเซี่ยมที่มีปริมาณโปแตสเซี่ยมเท่ากับสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T จากเกลือโปแตสเซี่ยมคลอไรด์ (KCl) โดยคำนวณความเข้มข้นของ KCl ดังสูตรต่อไปนี้[23]

$$\frac{\text{Concentration in mg\% x 10 x Valence}}{\text{Atomic weight}} = \text{mEq./L.}$$

Valence of K^+ = 1

Atomic weight of K^+ = 39

จากสูตรจะได้

K Concentration (in mg%)

$$= \frac{\text{Atomic weight}}{10 \times \text{Valence}} \times \text{K concentration (in mEq./L.)}$$

$$= \frac{39}{10 \times 1} \times \text{K concentration (mEq./L.)}$$

นำสารละลายที่เตรียมได้ไปหาปริมาณโปแตสเซี่ยมอีกครั้งหนึ่งด้วย Flame Photometer เพื่อสอบดูว่ามีปริมาณโปแตสเซี่ยมเท่ากับสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T จริง แล้วให้ชื่อสารละลายนี้ว่า "Std.K"

5.2 นำ "Std.K" มาทดลองฉีดเข้าเส้นโลหิตดำให้กับหนูขาวกลุ่มที่ 7 ซึ่งมีจำนวน 8 ตัว โดยเริ่มให้ตั้งแต่ขนาด 0.05 มล. 0.15 มล. 0.20 มล. 0.25 มล. 0.30 มล. 0.40 มล. 0.45 มล. และ 0.50 มล. ตามลำดับ

บันทึกความดันโลหิตของหนูขาวก่อนและหลังให้ "Std.K"

6. ศึกษาผลของการฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ (Intravenous Injection) ของสิ่งสกัดจากเชื้อราที่ได้แยกอิออน (ions) ออกแล้ว

6.1 การแยกอิออน (ions) ออกจากสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T นำสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T มาบรรจุใน dialysis tubing ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว มัดปิดปาก tubing ให้แน่น และนำไปแช่ในน้ำกลั่น (tridistrilled water) ซึ่งมีปริมาตรเป็น 200 เท่าของปริมาตร ส่วน T ที่มีอยู่ใน dialysis tubing กวนให้น้ำที่อยู่รอบ ๆ dialysis tubing หมุนเวียนไปทั่วภาชนะโดยใช้ magnetic stirer เป็นเวลา 4 วัน โดยระหว่างนั้นจะเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อให้อิออนที่มีอยู่ภายใน dialysis tubing สามารถแพร่กระจายออกมาได้หมด

6.2 เมื่อ dialyse เสร็จแล้วนำส่วนที่เหลือใน dialysis tubing ไปตรวจหาปริมาณโปแตสเซี่ยมอีกครั้งหนึ่งด้วย Flame Photometer แล้วให้ชื่อสิ่งสกัดจากเชื้อราที่ผ่านการ dialysis แล้วนี้ว่า "ส่วน D"

นำ ส่วน D มาทดลองฉีดเข้าเส้นโลหิตดำให้กับหนูขาว กลุ่มที่ 8 จำนวน 8 ตัว โดยเริ่มให้ตั้งแต่ขนาด 0.05 มล. 0.10 มล. 0.15 มล. 0.25 มล. 0.30 มล. 0.35 มล. 0.40 มล. 0.45 มล. และ 0.50 มล. ตามลำดับ

บันทึกความดันโลหิตของหนูขาวก่อนและหลังให้ ส่วน D

7. ศึกษาฤทธิ์ต่อความดันโลหิตของสิ่งสกัดจากเชื้อราร่วมกับฤทธิ์ของยาที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติ (Autonomic drug)

7.1 การทดลองว่าฤทธิ์ของสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T จะเป็นประเภท Cholinergic หรือไม่ เพื่อจะได้ทราบว่าฤทธิ์ของสิ่งสกัดจากเชื้อราจะมีกลวิธานแนวเดียวกันกับ Acetylcholine หรือไม่ จึงได้ทำการทดลองเพื่อดูฤทธิ์ของสิ่งสกัดจากเชื้อราร่วมกันกับฤทธิ์ของ Atropine ซึ่งเป็น muscarinic cholinergic blocking agents โดยฉีด Atropine sulfate เข้าเส้นโลหิตดำในขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม

การทดลองนี้ได้ใช้ Acetylcholine เป็นตัวยาอ้างอิง (reference drug) โดยฉีด Acetylcholine เข้าเส้นโลหิตดำในขนาด 0.01 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัมลำดับการให้ยาต่าง ๆ มีดังนี้

ให้ Acetylcholine แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังให้ยา ดูจนกระทั่งความดันโลหิตกลับสู่ระดับปกติแล้ว จึงให้ Atropine sulfate หลังจากนั้นอีก 3 นาที ให้ Acetylcholine อีกครั้งหนึ่ง เพื่อดูผลของ Acetylcholine ต่อความดันโลหิตเปรียบเทียบกับผลครั้งแรก

ให้ Atropine sulfate รอประมาณ 3 นาที ให้สิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วนT ในขนาด 0.3 มล. แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

7.2 การทดลองว่าฤทธิ์ของสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T จะเป็น β - adrenergic blocking agent หรือไม่ กระทำโดยใช้ Propranolol ซึ่งเป็นβ - adrenergic blocking agent เป็นตัวยาอ้างอิง โดยฉีด Propranolol เข้าเส้นโลหิตดำในขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม[24]

7.2.1 ทำการทดลองเพื่อดูฤทธิ์ของสิ่งสกัดจากเชื้อราร่วมกับฤทธิ์ของ Adrenaline (Epinephrine) โดยการฉีด Adrenaline เข้าเส้นโลหิตดำในขนาด 0.003 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม[24] ซึ่งลำดับการให้ยาต่าง ๆ มีดังนี้

ให้ Adrenaline แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังให้ยา ดูจนกระทั่งความดันโลหิตกลับสู่ระดับปกติแล้ว จึงให้ Propranolol หลังจากนั้นอีก 3 นาที ให้ Adrenaline อีกครั้งหนึ่ง เพื่อดูผลของ Adrenaline ต่อความดันโลหิตเปรียบเทียบผลครั้งแรก

ให้ Adrenaline บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังให้ยา ดูจนกระทั่งความดันโลหิตกลับสู่ปกติ แล้วจึงให้สิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T ในขนาด 0.3 มล. หลังจากนั้นอีก 3 นาที ให้ Adrenaline อีกครั้งหนึ่ง แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

7.2.2 ทำการทดลองเพื่อดูฤทธิ์ของสิ่งสกัดจากเชื้อรา ร่วมกับฤทธิ์ของ Isoproterenol ซึ่งเป็น sympathominetic drug โดยการให้ Isoproterenol ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำในขนาด 0.002 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม[20] ลำดับการให้ยามีดังนี้

ให้ Isoproterenol แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังให้ยา ดูจนกระทั่งความดันโลหิตกลับสู่ปกติแล้วจึงให้ Propranolol หลังจากนั้นอีก 3 นาทีให้ Isoproterenol อีกครั้งหนึ่ง เพื่อดูผลของ Isoproterenol ต่อความดันโลหิตเปรียบเทียบกับผลครั้งแรก

ให้ Isoproterenol แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังให้ยา ดูจนกระทั่งความดันโลหิตกลับสู่ปกติแล้ว จึงให้สิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T ในขนาด 0.3 มล. หลังจากนั้นอีก 3 นาที ให้ Isoproterenol อีกครั้งหนึ่ง แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

7.3 การทดลองว่าฤทธิ์ของสิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T จะเป็น α - adrenergic blocking agent หรือไม่ กระทำโดยใช้ Phentolamine ซึ่งเป็น α - adrenergic blocking agent เป็นตัวยาอ้างอิง โดยฉีด Phentolamine เข้าเส้นโลหิตดำใน

ขนาด 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม[24] และได้ทำการทดลองเพื่อดูฤทธิ์ของสิ่งสกัดจากเชื้อราร่วมกับฤทธิ์ของ Noradrenaline โดยฉีด Noradrenaline เข้าเส้นโลหิตดำในขนาด 0.003 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม[24] ลำดับการให้ยามีดังนี้

ให้ Noradrenaline แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังให้ยา ดูจนกระทั่งความดันโลหิตกลับสู่ปกติแล้วจึงให้ Phentolamine หลังจากนั้นอีก 3 นาทีให้ Noradrenaline อีกครั้งหนึ่ง เพื่อดูผลของ Noradrenaline ต่อความดันโลหิตเปรียบเทียบกับผลครั้งแรก

ให้ Noradrenaline แล้วบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังให้ยา ดูจนกระทั่งความดันโลหิตกลับสู่ปกติแล้ว จึงให้สิ่งสกัดจากเชื้อรา ส่วน T ในขนาด 0.3 มล. หลังจากนั้นอีก 3 นาที ให้ Noradrenaline อีกครั้งหนึ่ง บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

8. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำผลการทดลองที่บันทึกบนกระดาษกราฟ มาหาอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) และค่ากวามดันโลหิต (mean arterial pressure) ของหนูขาว ก่อนให้ยาเปรียบเทียบกับเมื่อหลังให้ยา แล้วจึงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจ และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตหลังให้ยาพร้อมทั้งระยะเวลาในการออกฤทธิ์ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปทดสอบความมีนัยสำคัญ (Test of significant) ดังนี้

8.1 Paired Student's t - test[25] ใช้ทดสอบความแตกต่างของอัตราการเต้นของหัวใจ และความดันโลหิตของหนูขาว โดยเปรียบเทียบในหนูขาวตัวเดียวกัน ขณะก่อนให้ยาและหลังให้ยา ซึ่งการทดลองทั้งหมดจะมี 8 กลุ่มคือ

หนูกลุ่มที่ 1 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน T ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน B ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 3 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน M ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 4 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน S ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ

หนูกลุ่มที่ 5 จำนวน 8 ตัว ให้ NSS ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 6 จำนวน 8 ตัว ให้ PDB ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 7 จำนวน 8 ตัว ให้ Std.K ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 8 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน D ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ

แต่ละกลุ่มจะให้ยาในขนาดต่าง ๆ 10 ขนาดคือ ตั้งแต่ 0.05 มล. 0.10 มล. 0.15 มล. 0.20 มล. 0.25 มล. 0.30 มล. 0.35 มล. 0.40 มล. 0.45 มล. และ 0.50 มล.ตามลำดับ

8.2 Linear Regression จากผลการทดลองศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัด (extracts) จากเชื้อราทั้ง 4 ชนิด โดยนำเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต และระยะเวลาในการออกฤทธิ์มาเขียนเป็นกราฟ เพื่อแสดง dose - response characteristics

ทดสอบว่าขนาด (dose) ของสิ่งสกัดจากเชื้อรา จะมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจ การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต และระยะเวลาในการออกฤทธิ์หรือไม่ โดยการทำ Regression analysis(5)(26) เพื่อดูอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าผันแปร Y เมื่อค่าผันแปร X เปลี่ยนไป

ค่าผันแปร Y คือเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจหรือเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต หรือระยะเวลาในการออกฤทธิ์ แล้วแต่กรณี

ค่าผันแปร X คือ Dose ซึ่งเป็นขนาดของสิ่งสกัดจากเชื้อราที่ฉีดให้กับหนูขาว

คำนวณ Regression Y on X เพื่อเขียน Regression Line และหาค่า Correlation Coefficient (r)

ผลการทดลองที่นำมาทำ Regression analysis ได้จากกลุ่มการทดลองต่อไปนี้

หนูกลุ่มที่ 1 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน T ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน B ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 3 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน M ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ
หนูกลุ่มที่ 4 จำนวน 8 ตัว ให้ ส่วน S ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำ

8.3 Least Siginificant Difference (LSD)[25] เพื่อเปรียบเทียบผลของการฉีดเข้าเส้นโลหิตดำของสิ่งสกัด (extracts) จากเชื้อรา และสารที่เตรียมขึ้นรวมทั้งหมด 8 กลุ่มดังกล่าว (ดูข้อ 8.1) เปรียบเทียบโดยใช้ F - test โดยการทำ Analysis of Variance ถ้า F - test มีนัยสำคัญทางสถติ จะเปรียบเทียบต่อไป เพื่อดูว่าคู่ไหนจะมีความสัมพันธ์กันบ้าง โดยใช้ LSD