บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

2.1 วัสดุ สัตว์ทดลอง และเครื่องมือ

2.1.1 คางคก (Bufo melanostictus Schneider)

จากภาคกลางของประเทศไทย

2.1.2 สัตว์ทดลองใช้

กระต่าย (Rabbit) เพศผู้และเพศเมีย

หนูขาว (Rat) เพศเมีย

หนูตะเภา (Guinea pig) เพศผู้และเพศเมีย

หนูถีบจักร (Mice) เพศผู้

2.1.3 เครื่องมือ

2.1.3.1 Isolated Organ Tissue Bath (Phipps and Bird, Inc.)

2.1.3.2 Harvard Apparatus Recorder Model 350

2.1.3.3 Harvard Apparatus Isotonic Force Transducer

2.2 วิธีทำการวิจัย

2.2.1 วิธีการเตรียมยางคางคกจากต่อม Parotoids

โดยใช้แผ่นพลาสติกใสทำเป็นกล่องสี่เหลี่ยม ขนาดกว้างและยาวประมาณ 1 ฟุต สูงประมาณ $\frac{1}{2}$ ฟุต กล่องนี้ไม่มีด้านข้าง 2 ด้าน เพื่อใช้มือล้อดเข้าไปจับตัวคางคก ใช้ Petridish ชนิดกลมติดด้านบนกล่องให้คว่ำลงสำหรับเก็บยางที่พุ่งออกไปจากต่อม Parotoids นำคางคกมาล้างผิวให้สะอาด ใส่เข้าไปในกล่อง ใช้ forcept บีบที่ต่อม Parotoids ทีละข้าง ยางสีขาวจะพุ่งออกมาแตะกับ dish วางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-5 วัน ได้เป็นเกล็ดสีน้ำตาลอ่อน บาง และเปราะหักง่าย

2.2.2 การเตรียมสารละลายยางคางคก

โดยชั่งยางคางคกแห้ง 100 มก. บดให้ละเอียด ละลายด้วย 15 มล. ethyl alcohol แล้วเติม normal saline จนครบ 30 มล. กรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายที่ได้มีตะกอนละเอียดแขวนลอยอยู่บ้าง ใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บไว้ในตู้เย็น เป็น stock solution จะเตรียมขึ้นใหม่ทุก 1 เดือน เมื่อจะทำการทดลองก็นำสารละลายนี้มาทำให้เจือจางด้วย normal saline จนได้ขนาด 0.10 มก. ต่อ มล. ซึ่งมี ethyl alcohol ประมาณ 1.425%

2.2.3 ศึกษาฤทธิ์ต่อการบีบตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้ของหนูถีบจักรปกติ โดยดูการเคลื่อนของ Animal charcoal ตามวิธีของ Macht[30]

ใช้หนูถีบจักรเพศผู้ แบ่งเป็น 6 กลุ่ม หนูทั้งหมดจะต้องอดอาหารก่อนนำมาทำการทดลองอย่างน้อย 12-15 ชั่วโมง ให้น้ำได้เพียงอย่างเดียว

เตรียม charcoal meal โดยใช้ tragacanth 2 กรัม เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย บดให้ขึ้นก่อน แล้วเติม charcoal ทำเป็น suspension เติมน้ำกลั่นจนครบ 130 มล. เขย่าขวดทุกครั้งก่อนใช้

กลุ่มที่ 1 เป็น control ใช้หนูน้ำหนักประมาณ 22-23 กรัม จำนวน 10 ตัว ฉีด 0.2 มล. normal saline เข้าทางช่องท้องก่อน 5 นาที แล้วจึงให้ 0.25 มล. charcoal meal ทางปาก โดยใช้เข็มป้อนยา (oral needle) ภายหลัง 15 นาทีต่อมาฆ่าหนูทั้งหมด

กลุ่มที่ 2 ใช้หนูน้ำหนักประมาณ 24-25 กรัม จำนวน 10 ตัว ฉีด 0.2 มล. 0.13% สารละลายยางคางคกใน normal saline (10.8 มก. ต่อ กก.) เข้าทางช่องท้อง ก่อน 5 นาที ต่อมาทำเช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 3 ใช้หนูน้ำหนักประมาณ 28-30 กรัม จำนวน 10 ตัว ฉีด 0.25 มล. 0.13% สารละลายยางคางคกใน normal saline (11.1 มก. ต่อ กก.) เข้าทางช่องท้อง พร้อมกับให้ 0.25 มล. charcoal meal ทางปาก ต่อมาทำเช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ 1 และ 2

กลุ่มที่ 4 เป็น control ใช้หนูน้ำหนักประมาณ 23-24 กรัม จำนวน 19 ตัว ฉีด 0.1 มล. 25% ethyl alcohol เข้าทางช่องท้อง 5 นาทีต่อมาให้ 0.2 มล. charcoal meal

ทางปาก ภายหลัง 15 นาที ฆ่าหนูทั้งหมด

กลุ่มที่ 5 ใช้หนูน้ำหนัก 20 กรัม จำนวน 20 ตัว เตรียมสารสกัดจากหนังคางคก โดยวิธีของ Ohno, S และคณะ[31] นำหนังคางคกมาตากแดดให้แห้ง ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ สกัดด้วย methanol 3 ครั้ง นำส่วนของ methanol มาระเหยใน vacuum evaporator แล้วสกัดด้วย petroleum ether ได้เป็นตะกอน ส่วนตะกอนละลายใน methanol ส่วนที่ละลายใน methanol นำมาระเหยใน vacuum evaporator แล้วสกัดด้วย chloroform 2 ครั้ง ส่วนของ chloroform ทำให้แห้ง ได้เป็นกลุ่ม crude bufogenins นำมาทำเป็น stock solution ขนาด 4.25% ใน ethyl alcohol ใช้ 1 มล. ทำเป็น 1.06% ใน 25% ethyl alcohol ฉีดเข้าช่องท้องหนู 0.1 มล. (55.0 มก. ต่อ กก.) 5 นาทีต่อมา ให้ 0.2 มล. charcoal meal ทางปาก ภายหลัง 15 นาที ฆ่าหนูทั้งหมด

กลุ่มที่ 6 ใช้หนูน้ำหนัก 24 กรัม จำนวน 20 ตัว ให้สารสกัดจากยางแห้ง ซึ่งสกัดโดยวิธีเดียวกับการสกัดหนัง นำส่วนของกลุ่ม crude bufogenins มาทำเป็น 0.04% ใน 25% ethyl alcohol ฉีดเข้าช่องท้องหนู 0.1 มล. (15.4 มก. ต่อ กก.) ต่อมาทำเช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ 4 และ 5

เมื่อฆ่าหนูแล้วเปิดหน้าท้อง ตัดกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กออกมาวัดความยาวตั้งแต่ pylorus ถึง ileo-caecal junction และวัดระยะทางการเคลื่อนของ charcoal meal จากกระเพาะอาหาร นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระยะทางการเคลื่อนของ charcoal meal จากกระเพาะอาหารต่อความยาวของลำไส้เล็กตั้งแต่ pylorus ถึง ileo-caecal junction แล้วหาค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน (S.E.) และค่า P

2.2.4 ศึกษาฤทธิ์ต่อการบีบตัวของลำไส้กระต่าย

2.2.4.1 เตรียมลำไส้ส่วน Jejunum ของกระต่าย โดยให้กระต่ายอดอาหาร 12-15 ชั่วโมง ทำให้กระต่ายหมดความรู้สึก โดยใช้ไม้ตีที่บริเวณรอยต่อของส่วนหัวกับคอ เปิดหน้าท้อง ตัดลำไส้ส่วนที่อยู่ต่ำจากกระเพาะอาหาร ประมาณ 5-10 ซม. จนถึงส่วนของ caecum[32] นำมาแช่ในสารละลาย Tyrodes ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 1 สารละลายนี้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมี oxygen บริสุทธิ์ผ่านตลอดเวลา ตัดลำไส้ให้ได้ความยาวประมาณ 1.5-2.0 ซม. ตัดเนื้อเยื่อ

| สารเคมี | จำนวนกรัม/ลิตร | Electrolyte | จำนวนมิลลิโมล/ลิตร |
|---|---|---|---|
| NaCl | 8.0 | $Na^+$ | 149.2 |
| KCl | 0.2 | $K^+$ | 2.7 |
| $MgCl_2$ | 0.1 | $Ca^{++}$ | 3.6 |
| $CaCl_2$ | 0.2 | $Mg^{++}$ | 2.1 |
| $NaH_2PO_4$ | 0.05 | $Cl^-$ | 145.3 |
| $NaHCO_3$ | 1.0 | $H_2PO_4^-$ | 0.4 |
| Glucose | 1.0 | $HCO_3^-$ | 11.9 |
| Aerating gas | pure $O_2$ | | |

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ Tyrode's solution

อื่น ๆ ออกให้หมด ใช้เชือกผูกปลายทั้งสองข้าง โดยปล่อยให้ปลายเปิดทั้งสองด้าน นำไปแขวนใน chamber ที่แช่อยู่ใน Isolated Organ Tissue Bath และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน chamber มีสารละลาย Tyrodes ซึ่งมี oxygen บริสุทธิ์ผ่านตลอดเวลา ปลายข้างหนึ่งของลำไส้ผูกติดกับขอแก้วใน chamber ส่วนอีกข้างหนึ่งใช้ด้ายโยงให้ตึงกับ Harvard Apparatus Isotonic Force Transducer ซึ่งต่อเข้ากับ Harvard Apparatus Recorder เพื่อบันทึกการทำงานของลำไส้ลงบนกระดาษดังรูปที่ 1

2.2.4.2 สารที่ใช้ทดลอง

สารละลายยางคางคกขนาด 0.17, 0.33, 0.50 และ 0.67 มคก. ต่อ มล.

Acetylcholine ขนาด 0.008 มคก. ต่อ มล.

5-Hydroxytryptamine (serotonin) ขนาด 0.05 มคก. ต่อ มล.

Histamine ขนาด 0.08 มคก. ต่อ มล.

2.2.4.3 ทดลองหาสารมายับยั้งฤทธิ์ของสารละลายยางคางคก โดยใช้

Atropine ขนาด 0.02 มคก. ต่อ มล.

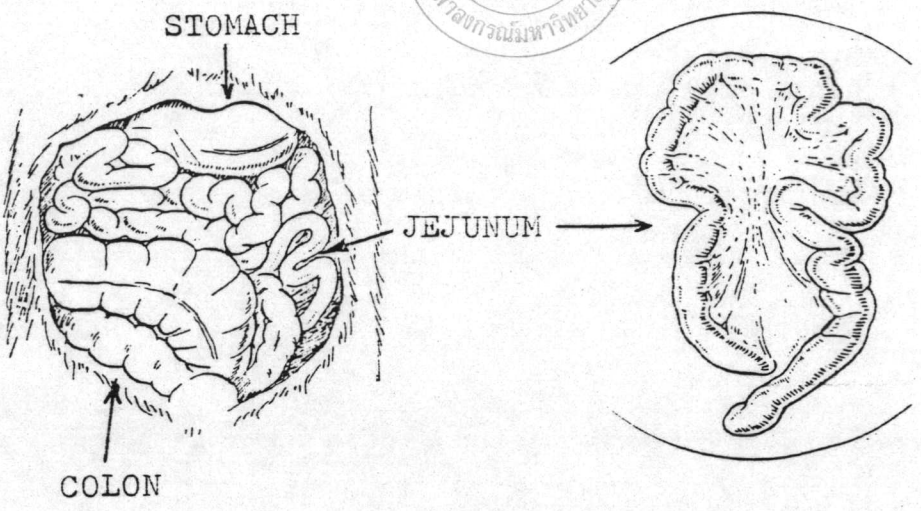
Cyproheptadine ขนาด 0.33 มคก. ต่อ มล.

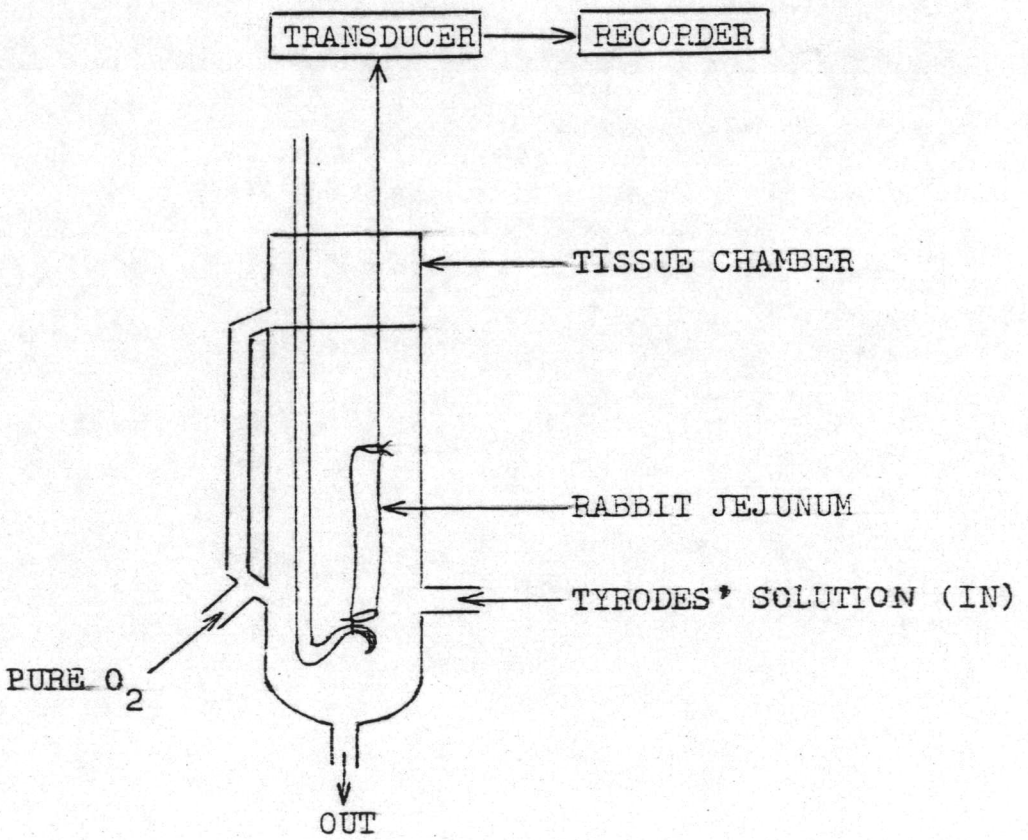
Diphenhydramine ขนาด 0.17 มคก. ต่อ มล.

2.2.4.4 ทดลองใช้สารสกัดจากไข่คางคก ซึ่งสกัดโดยวิธีของ Ohno, S และ Ohmoto, T[33]

นำไข่คางคกมาสกัดด้วย methanol ส่วนของ methanol นำมาระเหยที่ความดันต่ำ ๆ แล้วละลายใน petroleum ether เขย่ากับน้ำ ส่วนของ petroleum ether สกัดด้วย 50% methanol นำส่วนของ 50% methanol ไป condense และเทใส่ใน acetone ส่วนของ acetone นำมาระเหยและสกัดด้วย 50% methanol เทใส่น้ำ แล้วสกัดด้วย chloroform ทำให้แห้ง ได้เป็นสารที่มีลักษณะคล้ายน้ำมัน เป็นกลุ่มของ crude bufogenins นำส่วนนี้มาละลายด้วย 50% ethyl alcohol ใน normal saline ใช้ทดลองในขนาด 0.34 และ 1.7 มคก. ต่อ มล. เปรียบเทียบกับ Ouabain ขนาด 0.05 และ 5.00 มคก. ต่อ มล.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 1 แสดงการเตรียม Isolated rabbit jejunum

2.2.5 ศึกษาฤทธิ์ต่อการบีบตัวของมดลูกหนูขาวและหนูตะเภาที่แยกออกมาจากตัว

2.2.5.1 เตรียมมดลูกหนูขาว และหนูตะเภา โดยใช้หนูขาวเพศเมียน้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม และหนูตะเภาเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม ที่อยู่ในระหว่าง estrous cycles ซึ่งตรวจได้โดยทำ vaginal smear[34]

ทำให้หนูหมดความรู้สึกโดยใช้ไม้ตีที่บริเวณรอยต่อของส่วนหัวกับคอ แล้วเปิดหน้าท้อง[32] ตัดมดลูกทั้ง 2 ข้าง นำมาแช่ในสารละลาย Ringer-Locke ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2 สารละลายนี้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมี oxygen บริสุทธิ์ผ่านตลอดเวลา ตัดมดลูกให้ได้ความยาวประมาณ 1.5-2.0 ซม. แล้วนำมาแขวนใน chamber ที่แช่อยู่ใน Isolated Organ Tissue Bath และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน chamber มีสารละลาย Ringer-Locke ซึ่งมี oxygen บริสุทธิ์ผ่านตลอดเวลา ปลายทั้งสองข้างผูกโยงเข้ากับเครื่องมือเช่นเดียวกับลำไส้ ดังรูปที่ 2

2.2.5.2 สารที่ใช้ทดลอง

สารละลายยางคางคกขนาด 0.17, 0.33 และ 1.00 มคก. ต่อ มล.

Oxytocin ขนาด 0.007 ยูนิต ต่อ มล.

Adrenaline ขนาด 0.03 และ 0.17 มคก. ต่อ มล.

2.2.5.3 ทดลองหาสารมายับยั้งฤทธิ์ของสารละลายยางคางคก โดยใช้

Propranolol ขนาด 0.33 มคก. ต่อ มล.

Phentolamine ขนาด 0.25 มคก. ต่อ มล.

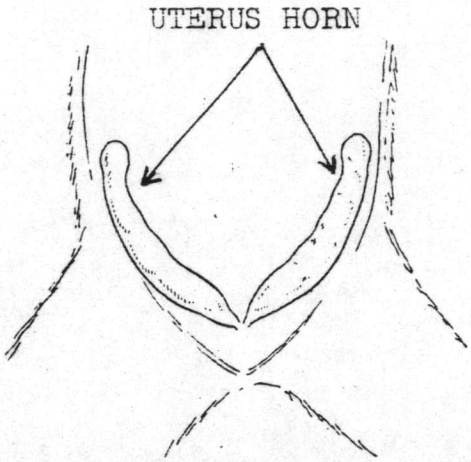
2.2.5.4 ทดลองใช้สารสกัดจากหนังคางคก โดยทำการสกัดวิธีเดียวกับที่ใช้ทดลองฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักรเพื่อศึกษาฤทธิ์ต่อกระเพาะอาหารและลำไส้ นำส่วนของ crude bufogenins มาละลายด้วย 50% ethyl alcohol ใน normal saline สำหรับใช้ในการทดลอง โดยใช้ขนาด 30.00 และ 60.00 มคก. ต่อ มล.

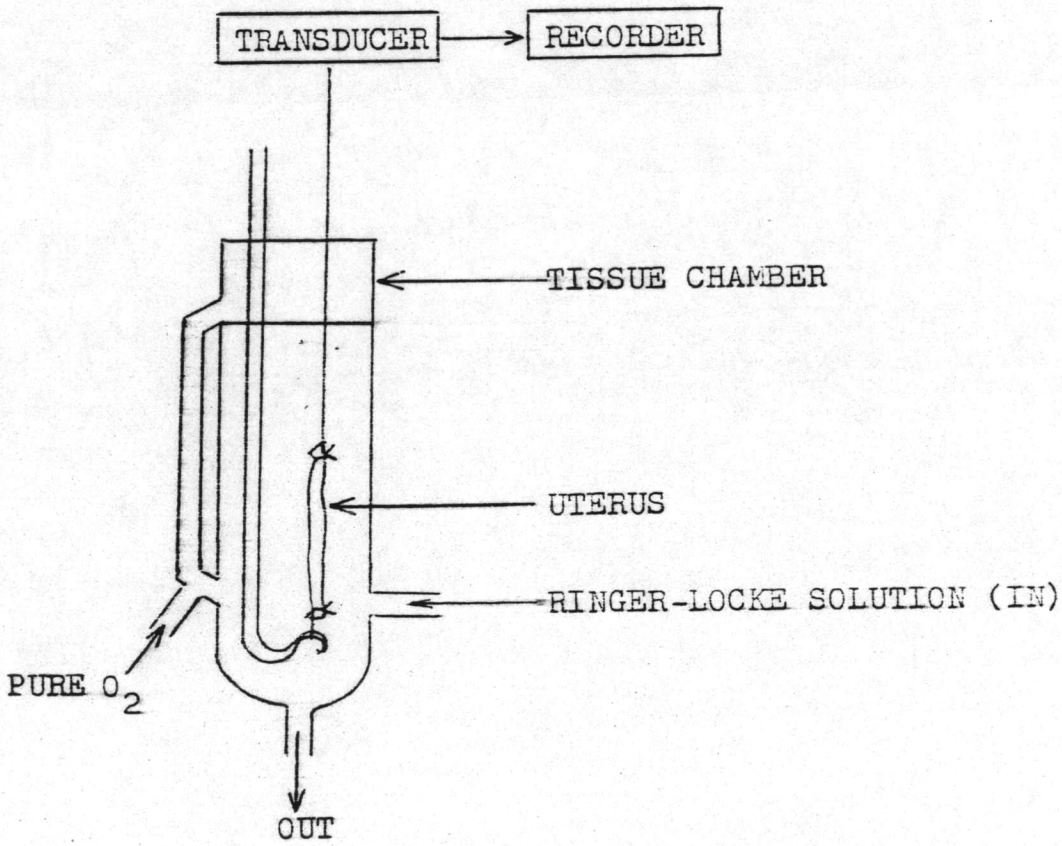
2.2.6 ศึกษาฤทธิ์ต่อหลอดลมหนูตะเภาที่แยกออกมาจากตัว

2.2.6.1 เตรียมหลอดลมหนูตะเภาโดยใช้หนูตะเภาน้ำหนักตั้งแต่ 300 กรัมขึ้นไป ทำให้หนูหมดความรู้สึกโดยใช้ไม้ตีที่บริเวณรอยต่อระหว่างส่วนหัวกับคอ เปิดที่ลำคอ แล้วตัดหลอดลม นำ

| สารเคมี | จำนวนกรัม/ลิตร | Electrolyte | จำนวนมิลลิโมล/ลิตร |
|---|---|---|---|
| NaCl | 9.0 | $Na^+$ | 155.8 |
| KCl | 0.42 | $K^+$ | 5.6 |
| $CaCl_2$ | 0.24 | $Ca^{++}$ | 4.3 |
| $NaHCO_3$ | 0.5 | $Cl^-$ | 163.9 |
| Glucose | 1.0 | $HCO_3^-$ | 6.8 |
| Aerating gas | pure $O_2$ | | |

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของ Ringer Locke solution




รูปที่ 2 แสดงการเตรียม Isolated uterus โดยใช้มดลูกของหนูขาว และหนูตะเภา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



มาแช่ในสารละลาย Krebs ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3 สารละลายนี้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมี 95% oxygen กับ 5% carbondioxide ผ่านตลอดเวลา แล้วตัดตามขวางระหว่างปล้องของกระดูกอ่อนผูกติดกันด้วยเชือกให้ได้ 5-6 ปล้อง โดยสลับกันระหว่างด้านที่เป็นกล้ามเนื้อเรียบและ cartilage[32] นำมาแขวนใน chamber ที่แช่อยู่ใน Isolated organ tissue bath และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน chamber มีสารละลาย Krebs ซึ่งมี 95% oxygen กับ 5% carbondioxide ผ่านตลอดเวลา ปลายทั้งสองข้างผูกติดกับเครื่องมือเช่นเดียวกับลำไส้และมดลูก ดังรูปที่ 3

2.2.6.2 สารที่ใช้ทดลอง

สารละลายคางคกขนาด 0.33, 0.67 และ 1.33 มคก. ต่อ มล.

DL-Isoproterenol HCl ขนาด 0.02 มคก. ต่อ มล.

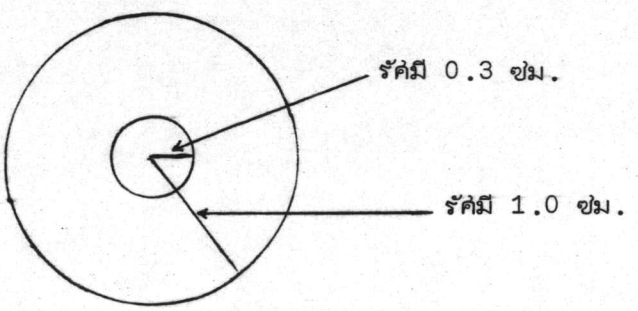
2.2.6.3 ทดลองหาสารมายับยั้งฤทธิ์ของสารละลายยางคางคก โดยใช้

Propranolol ขนาด 0.67 มคก. ต่อ มล.

2.2.6.4 ทดลองใช้สารสกัดจากหนังคางคกในส่วนของ crude bufogenins ขนาด 30.00 และ 50.00 มคก. ต่อ มล. เปรียบเทียบกับ ouabain ขนาด 5.00 มคก. ต่อ มล.

2.2.7 ศึกษาผลการเป็นยาชาเฉพาะที่ โดยเปรียบเทียบกับ Xylocaine ซึ่งเป็น Standard local anesthetic

ใช้หนูตะเภา 10 ตัว โกนขนที่แผ่นหลังออกให้หมด แบ่งเป็น 4 ส่วน ในแต่ละส่วนใช้หมึกเขียนเป็นวงกลมซ้อน 2 วง วงในรัศมี 0.3 ซม. วงนอกมีรัศมี 1.0 ซม.

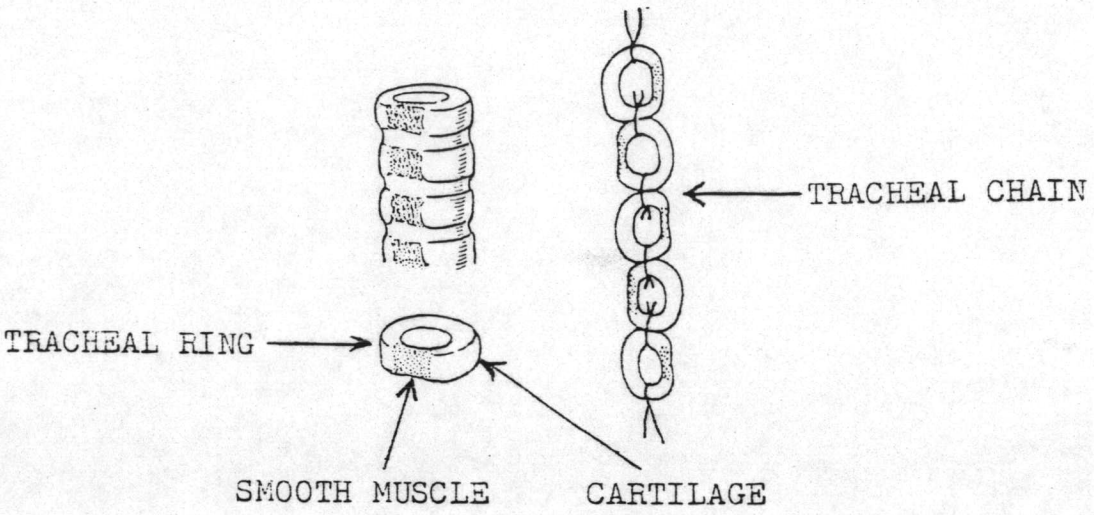


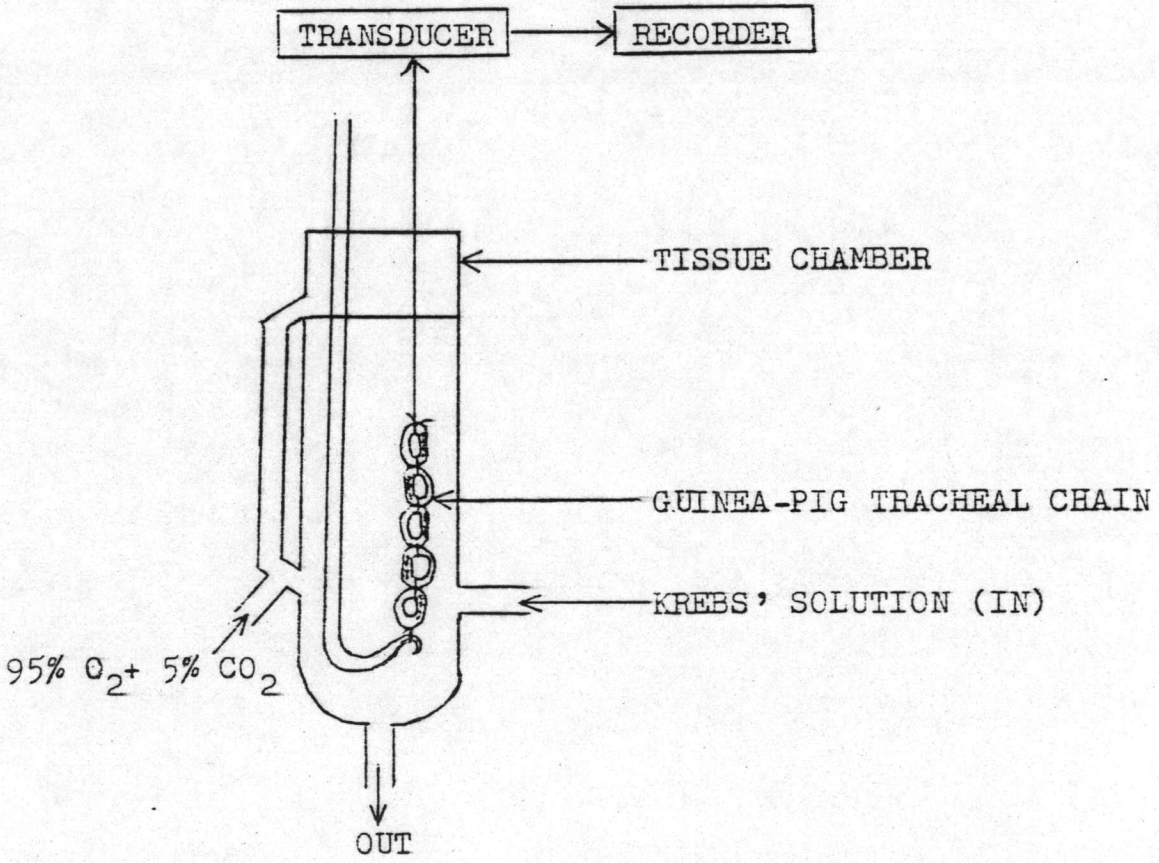

เป็นการทดลองแบบ double blind test ใช้สารอย่างละ 0.1 มล. ฉีดเข้าใต้ผิวหนังตรงจุดกลางของวงใน หลังจากนั้น 5 นาที ใช้เข็มปลายแหลมที่สุด เป็นเข็มฉีดยาใหม่ ๆ

| สารเคมี | จำนวนกรัม/ลิตร | Electrolyte | จำนวนมิลลิโมล/ลิตร |
|---|---|---|---|
| NaCl | 6.9 | $Na^{+}$ | 143.3 |
| KCl | 0.35 | $K^{+}$ | 5.9 |
| $MgSO_4\ 7H_2O$ | 0.29 | $Ca^{++}$ | 2.6 |
| $CaCl_2$ | 0.28 | $Mg^{++}$ | 1.2 |
| $KH_2PO_4$ | 0.16 | $Cl^{-}$ | 128.3 |
| $NaHCO_3$ | 2.1 | $H_2PO_4^{-}$ | 2.2 |
| Glucose | 2.0 | $HCO_3^{-}$ | 24.9 |
| | | $SO_4^{=}$ | 1.2 |
| Aerating Gas | 95% $O_2$ + 5% $CO_2$ | | |

ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของ Krebs' solution

004410




รูปที่ 3 แสดงการเตรียม Guinea-pig tracheal chain

แทงเบา ๆ ที่บริเวณภายในวงกลมทั้งวงในและวงนอก วงละ 5 ครั้ง ทำต่อไปทุก ๆ 5 นาที จนครบ 90 นาที เพื่อดูการตอบสนองของหนู ถ้าหนูรู้สึกเจ็บปวดจะสะดุ้งหรือร้อง ให้ใส่เครื่องหมาย + ถ้าหนูไม่แสดงอาการให้ใส่เครื่องหมาย - นำค่านี้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตอบสนองความรู้สึกที่ผิวหนังหนูตะเภาต่อจำนวนครั้งที่ใช้เข็มแทง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน (S.E.)

สารที่ใช้มีดังนี้

0.33% สารละลายยางคางคกใน 50% ethyl alcohol

50% ethyl alcohol

0.67% สารละลายยางคางคกใน normal saline

Normal saline

1% xylocaine

2% xylocaine