บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

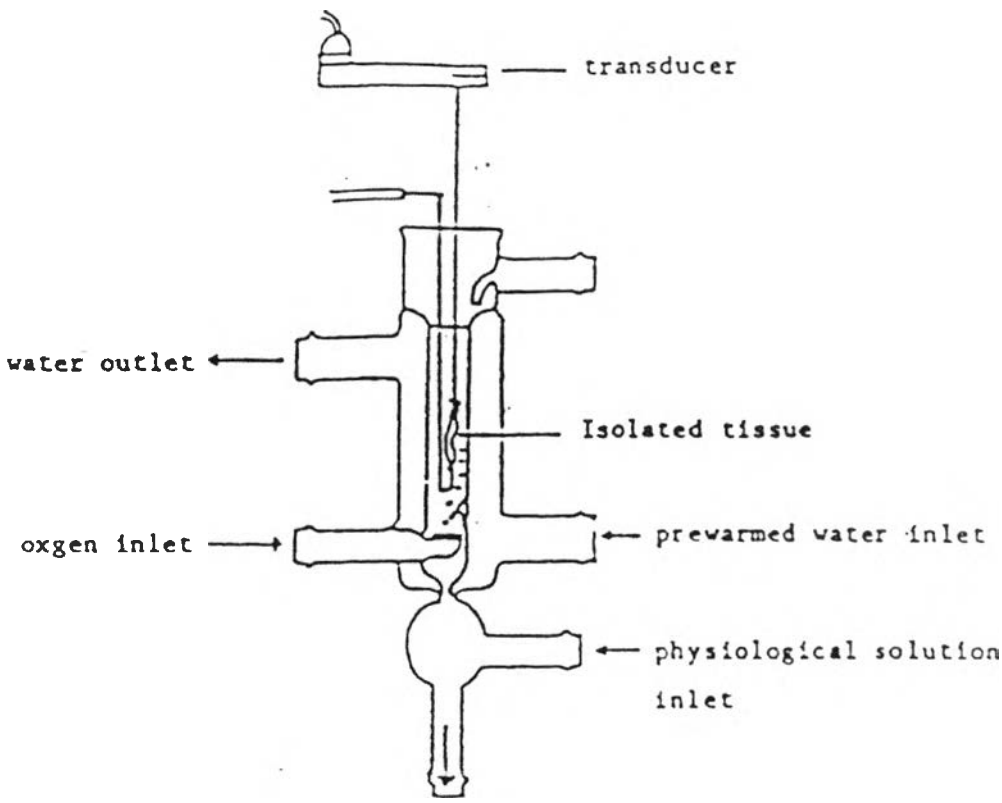
สัตว์ทดลอง เครื่องมือและสารเคมี

1. **สัตว์ทดลอง** จากสำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา กิ่ง อ.พุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม

- หนูขาวพันธุ์ Wistar rats เพศผู้ น้ำหนัก 200-350 กรัม
- หนูถีบจักรพันธุ์ Swiss mice เพศผู้ น้ำหนัก 25-30 กรัม
- หนูตะเภา เพศผู้ น้ำหนัก 300-400 กรัม

2. **เครื่องมือ**

- Organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุน้ำหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological solution)ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกมาทดลอง และมีช่องเปิดให้ก๊าซ carbogen (O_2 95 %+CO_2 5 %) ผ่านเข้ามาได้ ชั้นนอกของ Organ bath มีน้ำไหลเวียน เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37± 0.5 °C โดยมี เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoregulating water pump) เป็นตัวส่งน้ำและควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่อง Rotarod (Hugo Basile)
- เครื่องบันทึกผล (recorder) รุ่น Biopac Lab Pro MP30
- Water bath พร้อมเครื่อง Thermoregulating water pump
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด
- ถังบรรจุก๊าซ carbogen (O_2 95 %+CO_2 5%)
- ชุดผ่าตัดเล็ก
- กรรไกร
- Syringe + tubeป้อนยา (feeding tube)
- Test tube +สารป้องกันเลือดแข็งตัว (Heparin)



ภาพที่ 2 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่แยกออกจากกาย (Isolated organ)

3. **สารเคมี** ที่ใช้เตรียมสารละลาย Krebs-Henseleit จากบริษัท Sigma chemical Co., St Louis, U.S.A.

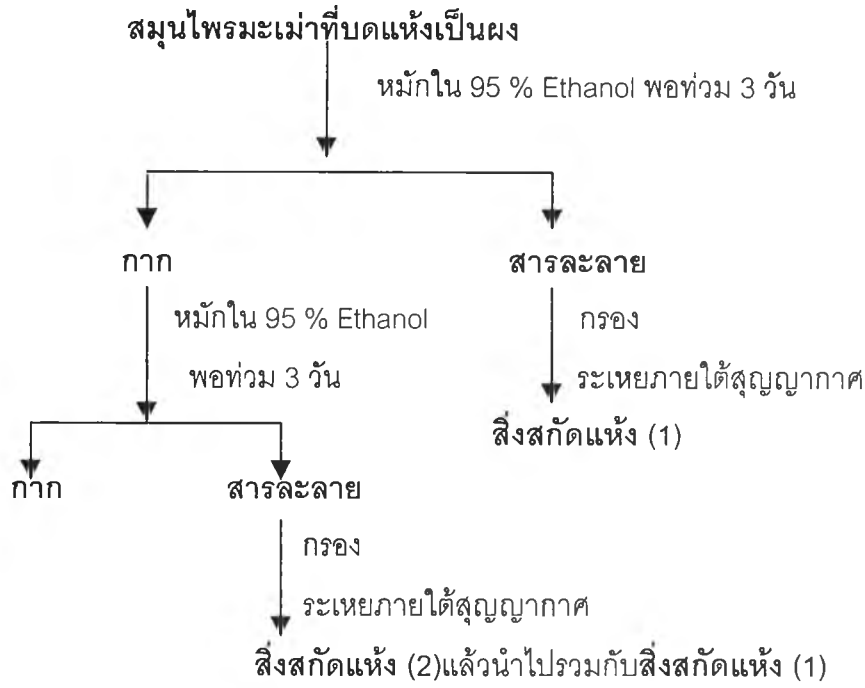
- Glucose
- Sodium chloride (NaCl)
- Potassium phosphate (KH_2PO_4)
- Potassium chloride (KCl)
- Magnesium sulphate ($MgSO_4$)
- Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)
- Calcium chloride ($CaCl_2$)

4. **สารมาตรฐาน** (Standard)

- Acetylcholine จาก Sigma Chemical Co.,St Louis,U.S.A.
- Histamine จาก Sigma Chemical Co.,St Louis,U.S.A.
- Norepinephrine hydrochloride (NE) จาก Sigma Chemical Co.,St Louis,U.S.A.
- Nembutal (Pentobarbiturate Sodium) จาก Vet Agritech co.LTD.
- Tween 80 จาก Asia Paciffic Specialty Chemicals Limited
- Tragacanth จาก Union Chemical 1986 co,LTD

การเตรียมสารทดสอบ (Test compound)

1. มะเม่าที่เลือกศึกษาคือ มะเม่าหลวง *Antidesma acidum* การเตรียมสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ทำโดยการหมักผงแห้งของรากมะเม่ากับ 95% ethanol แยกส่วน ethanol ทำให้แห้งด้วยอุณหภูมิต่ำภายใต้สูญญากาศ ได้สิ่งสกัดหรือ crude extract มีลักษณะข้นเหนียว สีน้ำตาล (ตามแผนภูมิที่ 1) เวลาใช้รับประทาน นำมาละลายกับ 5 % Tween 80 ได้เป็น solution สีน้ำตาล ซึ่งจะทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางกายภาพและเคมี แสดงถึงกระสวน (pattern) คุณลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพ (quality specification) และควบคุมคุณภาพ โดยตรวจด้วยวิธี Thin Layer chromatography (TLC) และ ได้ chromatogram แสดงลักษณะของส่วนประกอบในสิ่งสกัด TLC fingerprint (ตารางที่ 14)



แผนภูมิที่ 1 แผนภูมิการเตรียมสิ่งสกัดจากตัวอย่างสมุนไพรมะเม่า

วิธีการเตรียมสารสกัดสมุนไพรมะเม่าเพื่อใช้ในการทดสอบ

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในการศึกษาในครั้งนี้คือ 5% tween 80

2. เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ใช้ในสัตว์ทดลองในขนาด 30mg 60mg และ 120mg/Kg/BW ของสมุนไพรมะเม่าที่ใช้ในคนขนาด 60 mg/kgต่อวัน และใช้ในการทดลอง Isolated organ เตรียมให้ได้ความเข้มข้นขนาด 50 μg,100 μg, 200 μg, 400 μg/ml ใน organ bath

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า

1. สารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ใช้ขนาดสูงสุด 120 mg/kg/BW

   ปริมาณที่ให้ในสัตว์ทดลอง 120 mg/0.5 ml

   ปริมาณที่เตรียม 50 ml ต้องใช้สารสกัดมะเม่าจำนวน $\frac{120 \times 50}{0.5}$

   $\frac{12 \times 50}{0.5}$ = 12 g/50 ml

นำสารสกัดสมุนไพรมะเม่า 12 g มาละลายใน 5% tween 80 ปริมาณ 50 ml แล้วนำมา dilute ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

2. ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ใช้ใน organ bath

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

ปริมาณที่ใส่ใน organ bath = 0.1 ml (100 µl)

ความเข้มข้นสูงสุดในorgan bath = 400 µg / ml

$N_1 \times 100$ (µl) = 400 µg/ml x25000 (µl)

$\frac{400 \times 25000}{100}$ = 100,000 µg /100 (µl)

= 0.1 g/0.1 ml

= 100 mg/0.1 ml

โดย N_1 = ความเข้มข้นของสมุนไพรมะเม่าที่นำมาใช้

V_1 = ปริมาณของสมุนไพรมะเม่าที่เตรียมในตัวทำละลาย

N_2 = ความเข้มข้นของสมุนไพรมะเม่าใน organ bath (25 ml)

V_2 = ปริมาณของน้ำยาหล่อเลี้ยงเลี้ยงเนื้อเยื่อใน organ bath (25 ml)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. **ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อองค์ประกอบในเลือด ในหนูขาวที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน** (Micheal Bails 1983)

- แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่ม A ไม่ได้รับสารใด (n=8)

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม B ได้รับ5% Tween 80 ในขนาด 5 ml/kg/BW (n=8)

กลุ่มที่ 3 กลุ่ม C ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ในขนาด 30mg /kg/BW (n=8)

กลุ่มที่ 4 กลุ่ม D ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ในขนาด 60 mg /kg /BW (n=8)

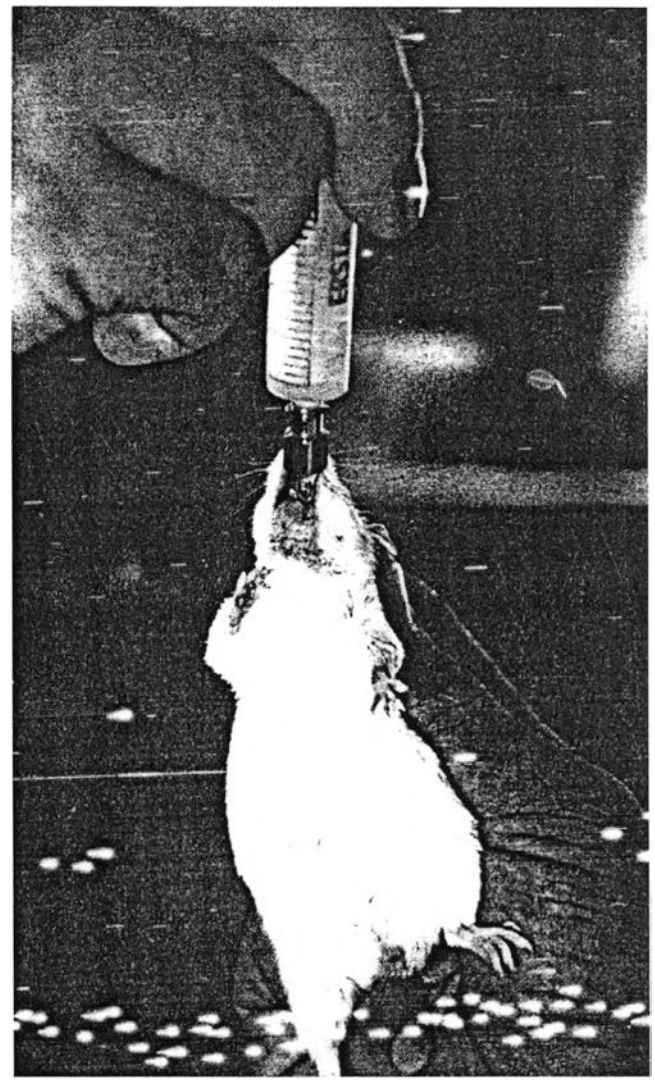
กลุ่มที่ 5 กลุ่ม E ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ในขนาด 120mg /kg /BW (n=8)

- เก็บเลือดหนูขาวทุกตัวที่ปลายหาง (ปานเทพ, 2535) ตัวละ 1 ml ใส่ใน Test tube ที่มีสาร Heparin ผสมอยู่ ส่งตรวจ CBC ซึ่งประกอบด้วย Red blood cell (Rbc), Hemoglobin(Hb), Hematocrit (Hct), platelet (Plt), White blood cell (WBC) และ Neutrophil, Eosinophil, Basophils, Lymphocyte, monocyte ส่งตรวจที่คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- จากนั้นให้หนูขาวได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 ตามกลุ่มและตามน้ำหนักตัว เป็นระยะเวลา 7 วันติดต่อกัน นำหนูมาเจาะเลือดตรวจ CBC ซึ่งประกอบด้วย

Rbc, Hb, Hct, WBC, Platelet, Neutrophil, Eosinophil, Basophils, Lymphocyte และ monocyte

- นำผลเลือดมาเปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่า โดยให้ผลก่อนได้รับสารทดสอบเป็น 100% ของแต่ละกลุ่มการทดลอง แล้วนำผลการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับสารทดสอบ มาเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง



ภาพที่ 3 แสดงการป้อนสมุนไพรมะเม่าเข้าทางปากของหนูขาว โดยใช้ feeding tube (ปานเทพ,2535)

2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กของหนูขาว

2.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กของหนูขาวโดยดูการเคลื่อนที่ของผงถ่าน (charcoal) (n=8) (พิณรัตน์ 2533)

การเตรียมผงถ่าน (charcoal) โดยใช้ Tragacanth เป็นสารช่วยแขวนตะกอนผงถ่าน โดยการบด Tragacanth 2 กรัม กับผงถ่าน 12 กรัมให้เข้ากันที่ละน้อย ๆ พร้อมเติมน้ำและบดต่อไป พร้อมกับเติมน้ำให้ครบ 130 ml

- เตรียมหนูขาวโดยให้งดอาหารก่อนการทดลอง 14-16 ชั่วโมง ดื่มน้ำได้ตามความต้องการของสัตว์ทดลอง
- แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่ม A ไม่ได้รับสารใด (n=8)

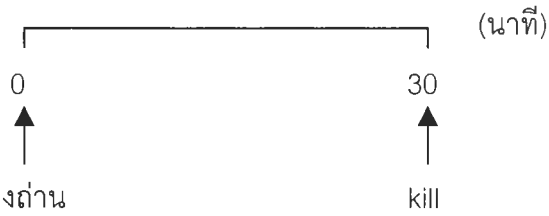
กลุ่มที่ 2 กลุ่ม B ได้รับ5% Tween 80 จำนวน 5 ml/kg/BW (n=8)

กลุ่มที่ 3 กลุ่ม C ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ในขนาด 30mg /kg/BW (n=8)

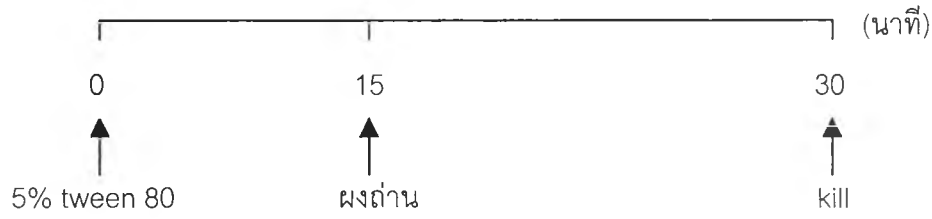
กลุ่มที่ 4 กลุ่ม D ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ในขนาด 60 mg /kg/BW (n=8)

กลุ่มที่ 5 กลุ่ม E ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด 120mg /kg/BW (n=8)

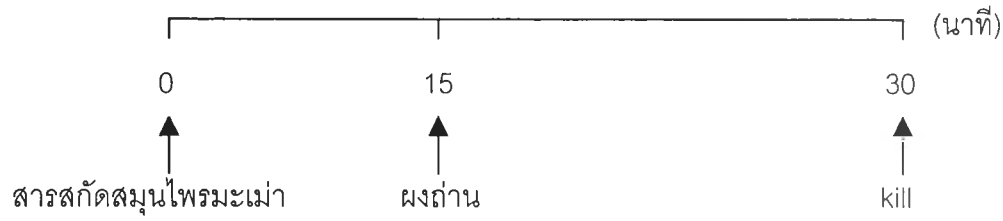
- กลุ่ม A กลุ่มควบคุม ไม่ได้รับสารใด ป้อนผงถ่านปริมาตร 0.5 ml เข้าทางปาก เมื่อครบเวลา 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัว วัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่าน โดยเปรียบเทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัว แสดงค่าเป็นร้อยละ



- กลุ่ม B ได้รับ 5% tween 80 ขนาด 5ml/kg/Bw เว้นระยะ 15 นาที ป้อนผงถ่านปริมาตร 0.5 ml เข้าทางปาก เมื่อครบเวลา 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัว วัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่าน โดยเปรียบเทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัว แสดงค่าเป็นร้อยละ

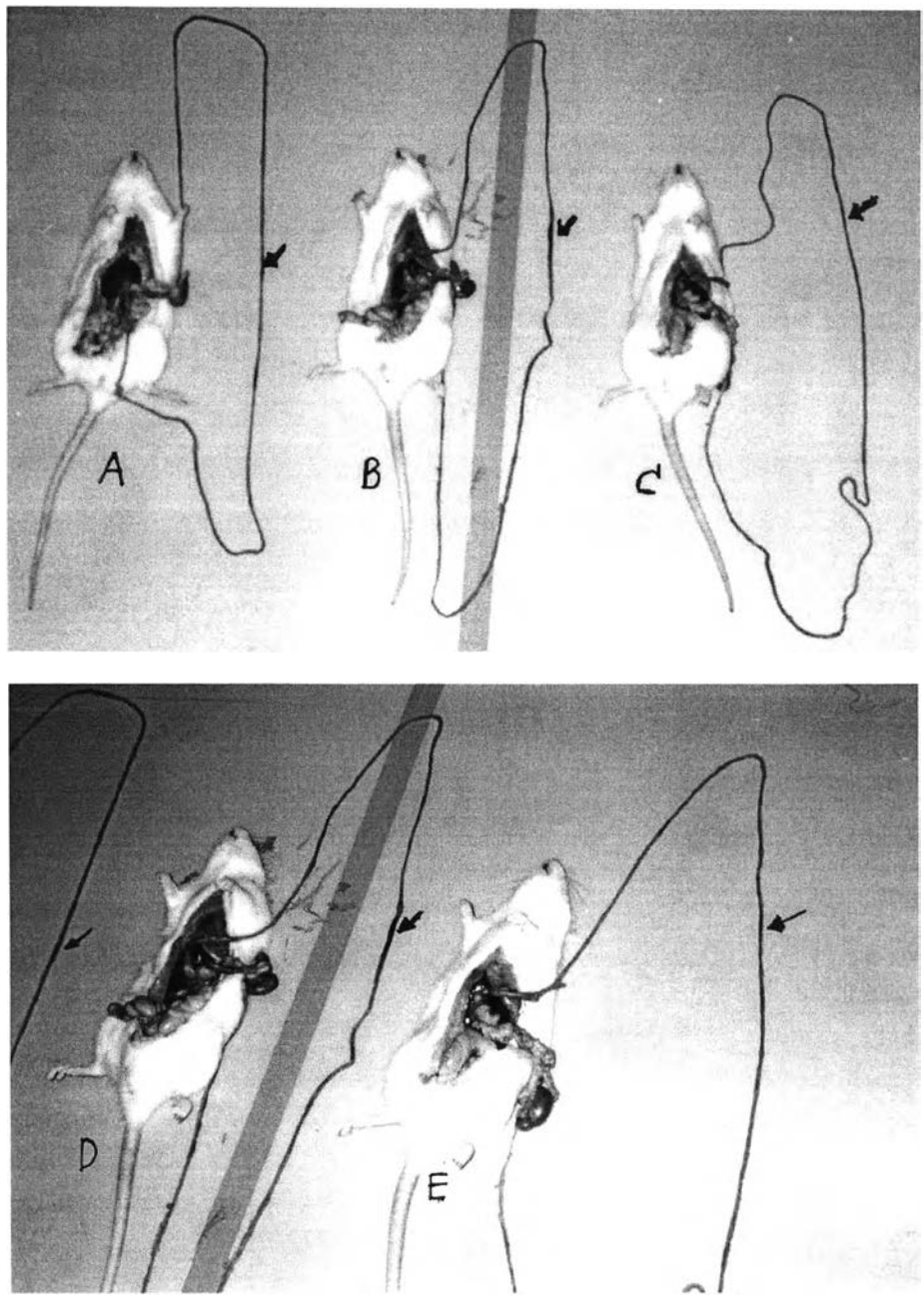


- กลุ่มทดลองได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าขนาด 30mg, 60mg, 120mg/kg/BW ในสารละลาย 5% Tween 80 เว้นระยะ 15 นาที ป้อนผงถ่านปริมาตร 0.5 ml เข้าทางปาก เมื่อครบเวลา 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัว วัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่าน โดยเปรียบเทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัว แสดงค่าเป็นร้อยละ



ขนาด 30mg, 60mg, 120mg/kg/BW ใน 5% tween 80 ในแต่ละกลุ่ม

- นำเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในทุกกลุ่มเปรียบเทียบกัน



ภาพที่ 4 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ไปของผงถ่านในลำไส้ของหนูขาวสภาพปกติภายหลังการได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

A = กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารใด

B = กลุ่มที่ 2 ได้รับ 5 % Tween 80 ในน้ำ 5 ml/kg/BW

C = กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด 30 mg/kg/BW

D = กลุ่มที่ 4 ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด 60 mg/kg/BW

E = กลุ่มที่ 5 ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด 120 mg/kg/BW

2.2 **ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกออกจากกายหนูขาว** (isolated ileum) (n=8) (Blattner et al ; 1980)

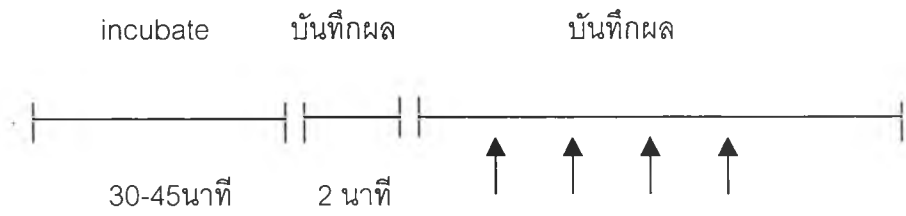
- เตรียมหนูขาว โดยให้งดอาหารก่อนการทดลอง 14-16 ชั่วโมงให้ดื่มแต่น้ำตามความต้องการของสัตว์ทดลอง

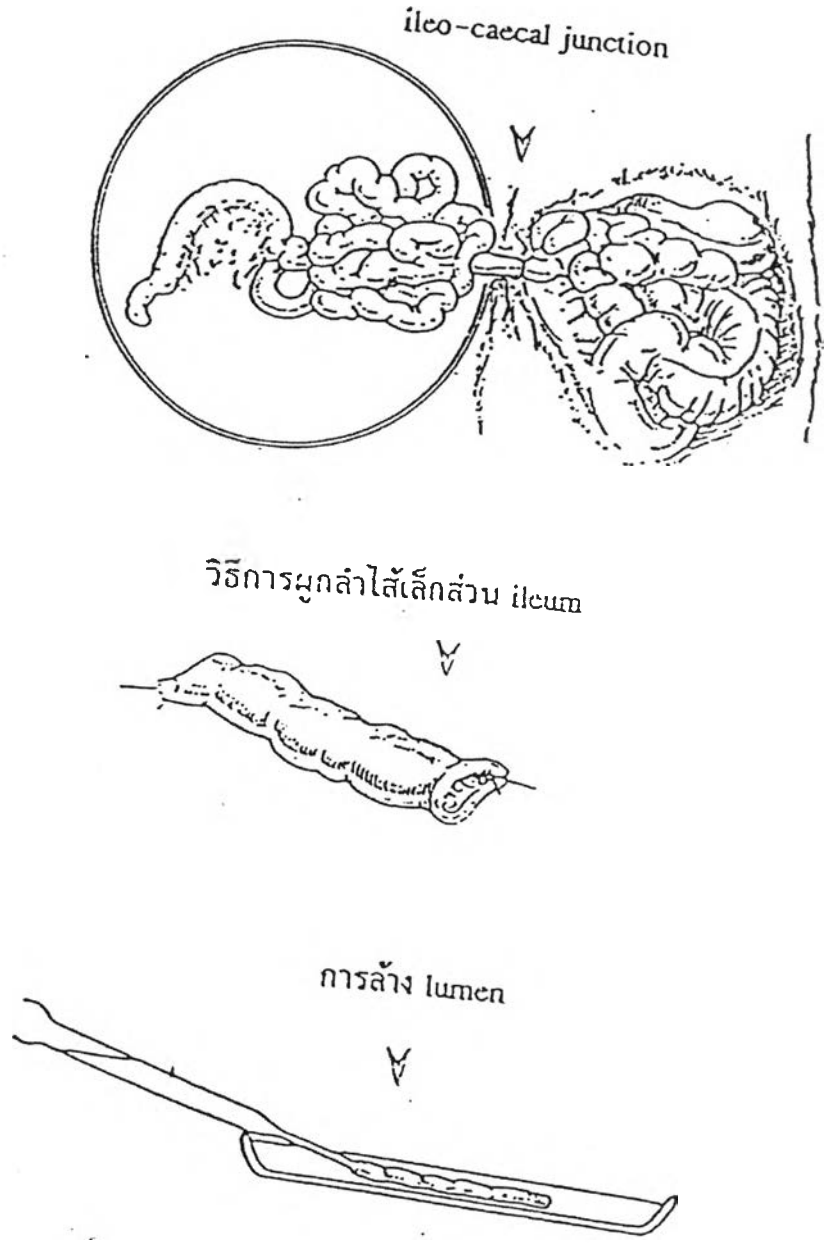
- ทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว ผ่าท้องเอาลำไส้เล็กส่วน ileum มาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs - Henseleit solution (KHS) และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างลำไส้ด้านในด้วยสารละลาย KHS ตัดแบ่งลำไส้เป็นท่อนยาวประมาณ 1 ซม. ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้าง โดยให้ปลายทั้งสองด้านเปิดเพื่อให้สารละลาย Kerbs ผ่านได้ ผูกปลายอีกด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37±0.5 C และบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 ml โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง ปรับให้ลำไส้มีการตึงตัวระหว่างพัก แล้ว incubate ลำไส้นานประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที

- incubate ลำไส้เล็กส่วน ileum ให้มีแรงตึงคงที่ในขณะพัก นานประมาณ 15 นาที เพื่อให้กล้ามเนื้อมีการเคลื่อนไหวได้เอง (spontaneous movement) ทำการบันทึกการเคลื่อนไหวหรือความถี่ในการหดตัว และความสูงของการหดตัวเพื่อใช้เป็นค่าควบคุม (control)

2.2.1 **ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% tween 80 ในน้ำ ต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว** (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในน้ำขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กส่วน ileum ทุก ๆ 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง เมื่อ incubate จนกระทั่งลำไส้เล็กส่วน ileum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 2 นาทีเป็น control แล้วจึงให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในน้ำ ในขนาด 0.1 ml ห่างกัน 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 5% Tween 80

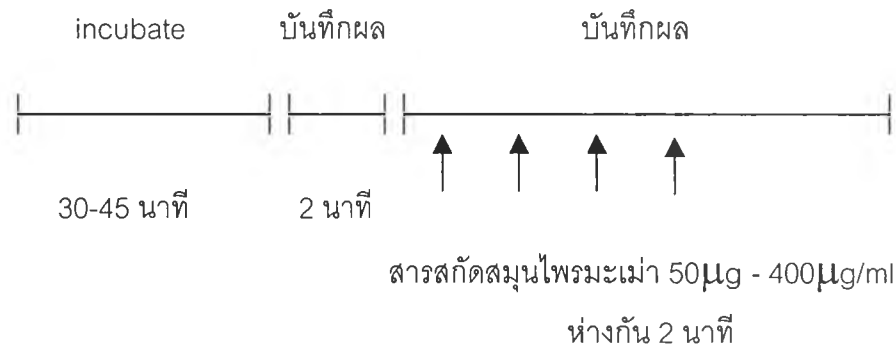




ภาพที่ 5 แสดงตำแหน่งลำไส้เล็กส่วน ileum และการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว (W.L.M. Perry,1968)

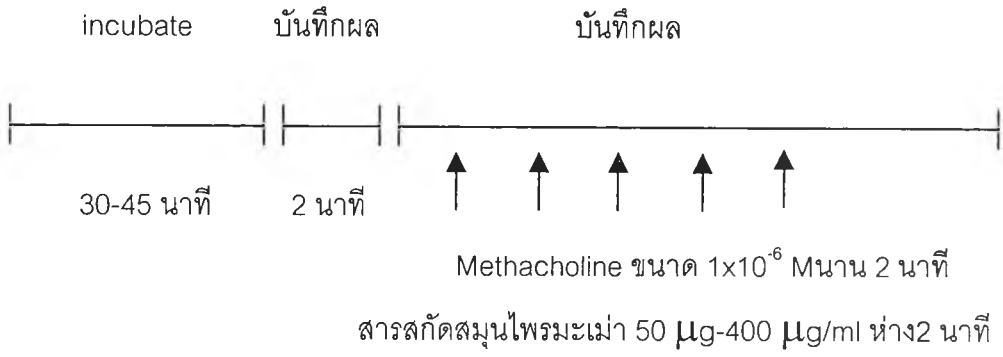
2.2.2 ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% tween 80 **ในขนาด** 50 μg, 100 μg, 200 μg, 400 μg/ml **ใน** organ bath **ต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน** ileum **ของหนูขาว** (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 ในน้ำที่ความเข้มข้น 50μg, 100μg, 200μg, 400μg/ml ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กส่วน ileum ห่างกัน 2 นาที โดยบันทึกผล 2 นาทีเป็น control แล้วจึงให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าห่างกันทุก 2 นาที บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 เปรียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง หลังจากนั้นล้างออกด้วย KHS หลาย ๆ ครั้ง incubate 30-45 นาทีจนกระทั่งลำไส้เล็กส่วน ileum มีการทำงานที่คงที่



2.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum **ของหนูขาว ที่ถูกกระตุ้นด้วย** Methacholine **ขนาด** $1x10^{-6}$ M **ก่อนให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด** 50 μg, 100 μg, 200 μg, 400 μg/ml (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 ในน้ำ ที่ความเข้มข้น 50μg,100μg, 200μg, 400μg/ml ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กส่วน ileum ห่างกัน 2 นาที โดยบันทึกผล 2 นาทีเป็น control ให้ Methacholine ขนาด $1x10^{-6}$M นาน 2 นาที แล้วจึงให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่า บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 เปรียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง หลังจากนั้นล้างออกด้วย KHS หลาย ๆ ครั้ง incubate 30-45 นาที จนกระทั่งลำไส้เล็กส่วน ileum มีการทำงานที่คงที่



3. **ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อระบบประสาทส่วนกลาง** (central nervous system)

3.1 **ศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ให้ร่วมกับ** pentobarbital sodium **โดยการบันทึกเวลาที่สูญเสีย** righting reflex (n=8) (Thomson, 1990)

- ชั่งน้ำหนักหนูถีบจักรแต่ละตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มคือ

  กลุ่มที่ 1 กลุ่ม A ไม่ได้รับสารใด (n=8)

  กลุ่มที่ 2 กลุ่ม B ได้รับ 5% Tween 80 จำนวน 5 ml/kg/BW ip (n=8)

  กลุ่มที่ 3 กลุ่ม C ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด 30mg /kg/BW ip (n=8)

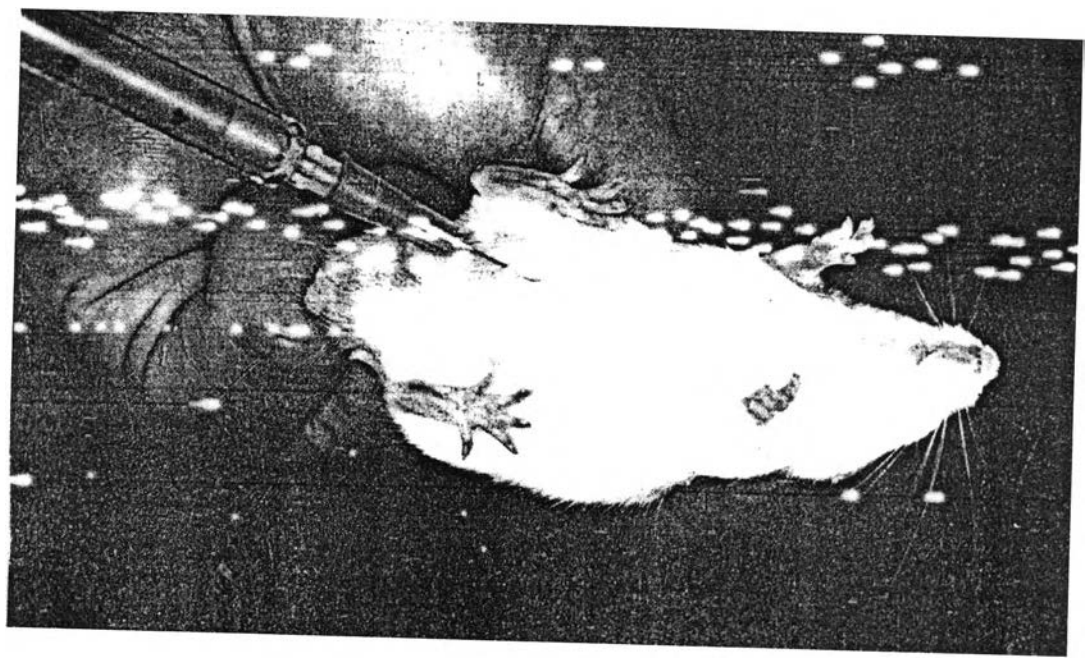
  กลุ่มที่ 4 กลุ่ม D ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด60 mg /kg/BW ip (n=8)

  กลุ่มที่ 5 กลุ่ม E ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด 120mg /kg/BW ip (n=8)

- หลังจากได้รับ 5% Tween 80 และสารสกัดสมุนไพรมะเม่าตามขนาดที่กำหนดตามกลุ่ม ให้ฉีด pentobarbital sodium ขนาด 30mg/kg/BW เข้าทางช่องท้อง (ip) ทันที

- ตรวจการสูญเสีย righting reflex ของหนูแต่ละตัว โดยจับหนูนอนหงายแล้วหนูไม่สามารถพลิกตัวกลับมาเหมือนเดิม (สูญเสีย righting reflex) บันทึกเวลาตั้งแต่ให้สารทดสอบ จนหนูสูญเสีย righting reflex สมบูรณ์ และ righting reflex กลับคืนมาสมบูรณ์ได้ onset of action และ duration of action ตามลำดับ

- นำผลการทดลองในหนูแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบกัน



ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งการฉีดเข้าทางช่องท้อง (ip) ของหนูถีบจักร (ปานเทพ,2535)

3.2 **ศึกษาฤทธิ์ของ สารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อ** motor co-ordination **โดยการทำ** Rotarod test

- ทำการทดลองตามแบบของ Dunham and Miya 1957 โดยให้หนูถีบจักรเดินบน rod ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 ซม. หมุน 13 รอบ/นาที

- ชั่งน้ำหนักหนูถีบจักรแต่ละตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่ม A ไม่ได้รับสารใด (n=8)

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม B ได้รับ5% Tween 80 ในขนาด 5 mg/kg/BW ip (n=8)

กลุ่มที่ 3 กลุ่ม C ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ในขนาด 30mg /kg/BW ip (n=8)

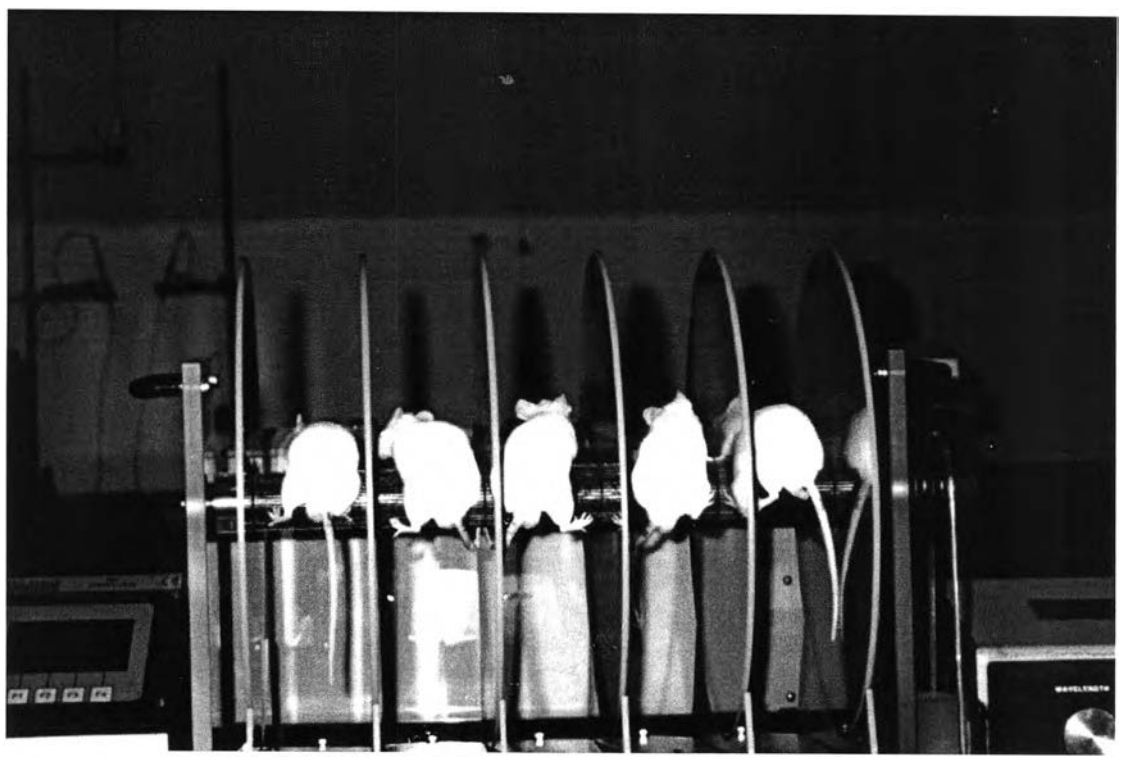
กลุ่มที่ 4 กลุ่ม D ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ในขนาด60 mg /kg/BW ip (n=8)

กลุ่มที่ 5 กลุ่ม E ได้รับสารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด120mg /kg/BW ip (n=8)

- หลังจากนั้นนำหนูมาเดินบน Rotarod bar ทำการบันทึกเวลาที่หนูสามารถไต่บน Rotarod bar ได้ โดย set เวลาไว้ที่ 0 เวลาจะหยุดเมื่อหนูตกลงมา ถ้าหนูสามารถเดินทรงตัวบน rod ได้อย่างน้อย 1 นาที ในการไต่ทั้งหมด 3 ครั้ง ถ้าไต่ผ่าน 3 ครั้ง จะถือว่าหนูมี motor co-ordination เป็นปกติ การทดสอบฤทธิ์ของสารทดสอบจะให้หนูเดินบน Rotarod bar หลังได้รับ สารทดสอบ ที่เวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง

- นำผลการทดลองที่ได้ในการไต่ 3 ครั้ง นำไปเปรียบเทียบกับหนูทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 แสดงการเดินบน Rotarod bar ของหนูถีบจักร

4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular system)

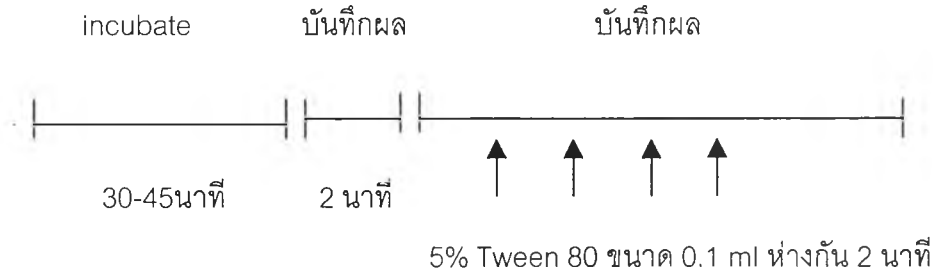
4.1 ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ต่อการบีบตัวของหัวใจห้องบนข้างขวา ที่แยกออกจากกายหนูขาว (Isolated right auricle) (n=8) (Rosario Jimenez,2002)

การเตรียมหัวใจส่วน right auricle

- ทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว
- เปิดช่องอกโดยใช้กรรไกรและปากคีบ เปิดกล้ามเนื้อตั้งแต่ใต้กระดูกหน้าอกออกทางด้านข้างจะเห็นหัวใจเต้นอยู่ในเยื่อหุ้มหัวใจ (pericardium) ทำการผ่าตัดเอาเยื่อหุ้มหัวใจออกให้หมดแล้วใช้กรรไกรเลาะตัดแยกหัวใจออกจากตัว มาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย KHS และก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลาตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างด้วยสารละลาย KHS แยก auricle ข้างขวาที่มี automaticity เต้นเป็นจังหวะออกมา ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้าง ผูกปลายด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath บรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 ml ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37± 0.5 C โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกการเต้นของ right auricle จนเต้นสม่ำเสมอ incubate หัวใจห้องบนขวานานประมาณ 30-45 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที

4.1.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% tween 80 **ในน้ำต่อการบีบตัวของหัวใจห้องบนข้างขวาและที่แยกออกจากกายหนูขาว** (isolated right auricle)

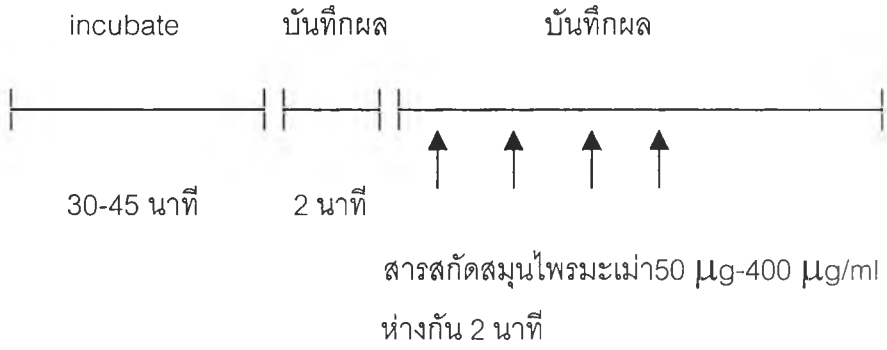
ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในน้ำขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีหัวใจห้องบนข้างขวา ทุก ๆ 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง เมื่อ incubate 30-45 นาที จนกระทั่งหัวใจห้องบนขวา มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 2 นาที เป็น control แล้วจึงให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในน้ำ ขนาด 0.1 ml ห่างกัน 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 5% Tween 80



5% Tween 80 ขนาด 0.1 ml ห่างกัน 2 นาที

4.1.2 **ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ที่ละลายใน** 5% tween 80 **ในน้ำในขนาด** 50 μg,100 μg, 200 μg, 400 μg/ml **ต่อการบีบตัวของหัวใจห้องบนข้างขวาที่แยกออกจากกายหนูขาว** (Isolated right auricle) (n=8)

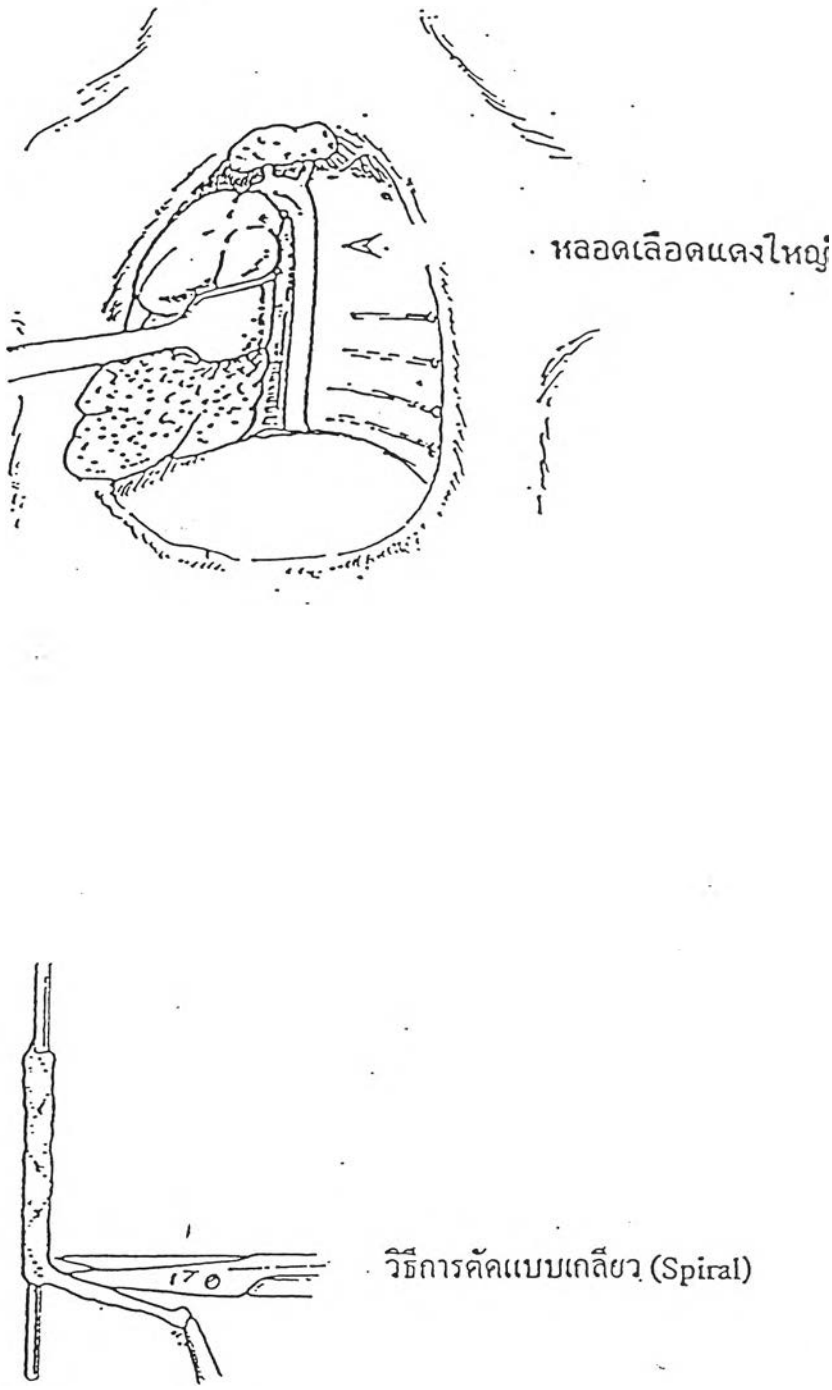
ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 ในน้ำ ที่ความเข้มข้น 50μg, 100μg, 200μg, 400 μg/ml ลงใน organ bath ที่มีหัวใจห้องบนข้างขวา ห่างกัน 2 นาที โดยบันทึกผล 2 นาทีเป็น control แล้วจึงให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่า บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 เปรียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง



4.2 **ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ต่อการบีบตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ ที่แยกออกจากกายหนูขาว** (isolated aorta) (n=8) (Rosario Jimenez,2002)

การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta)

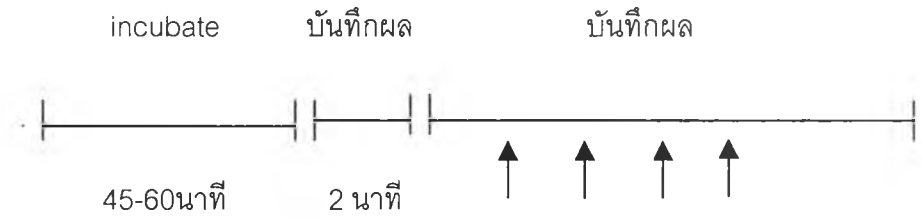
- ทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว
- ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายเอาหัวใจและปอดออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่กับกระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ในช่องอกตัดเอามาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย KHS และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ค่อย ๆ เลาะเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างเลือดที่อยู่ภายในหลอดเลือดออกให้หมด ด้วยสารละลาย KHS ตัดผนังหลอดเลือดเป็นเกลียว (spiral) แล้วตัดแบ่งเป็นท่อนยาวประมาณ 1 ซม. ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน ด้านหนึ่งผูกกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37± 0.5 C และบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 ml โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง incubate หลอดเลือดแดงใหญ่นานประมาณ 30-45 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที



ภาพที่ 8 แสดงตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่ (Thoracic aorta) และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว

4.2.1 **ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% tween 80 ในน้ำ ต่อการบีบตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจากกายหนูขาว** (isolated aorta) (n=8)

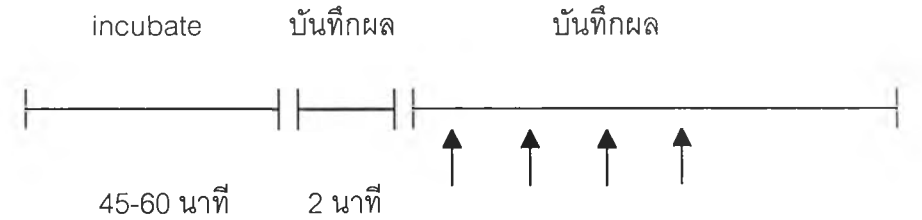
ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในน้ำขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแดงใหญ่ทุก ๆ 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง เมื่อ incubate 45-60 นาที จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีแรงตึงตัวคงที่แล้ว บันทึกผล 2 นาที เป็น control แล้วจึงให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในน้ำ ขนาด 0.1 ml ห่างกัน 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 5% Tween 80



5% Tween 80 ขนาด 0.1 ml ห่างกัน 2 นาที

4.2.2 **ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ที่ละลายใน 5% tween 80 ในน้ำในขนาด 50 μg, 100 μg, 200 μg, 400 μg/ml ต่อการบีบตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจาก กายหนูขาว** (isolated aorta) (n=8)

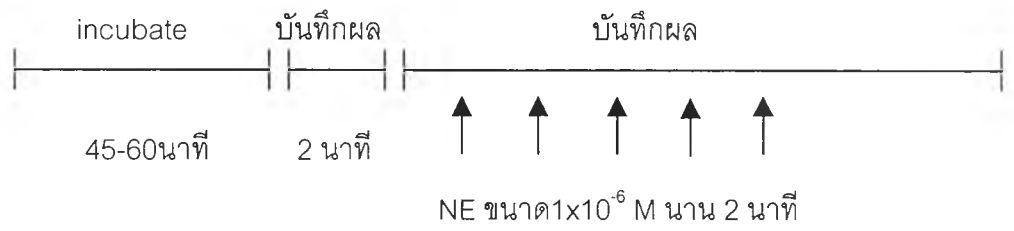
ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน5% Tween 80 ในน้ำ ที่ความเข้มข้น 50μg,100μg, 200μg, 400μg/ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแดงใหญ่ห่างกัน 2 นาที โดยบันทึกผล 2 นาที เป็น control แล้วจึงให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่า บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 เปรียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง หลังจากนั้นล้างออกด้วย KHS หลาย ๆ ครั้ง incubate 45-60 นาที จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีการทำงานที่คงที่



สารสกัดสมุนไพรมะเม่า50 μg-400 μg/ml
ห่างกัน 2 นาที

4.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ต่อการบีบของหลอดเลือดแดงใหญ่ ที่ถูกกระตุ้นด้วย Norepinephrine (NE) **ขนาด** $1x10^{-6}$ M **ก่อนให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่า ในขนาด**50 μg, 100 μg, 200 μg, 400 μg/ml (n=8) **ต่อการบีบตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ ที่แยกออกจากกายหนูขาว** (isolated aorta) (n=8)

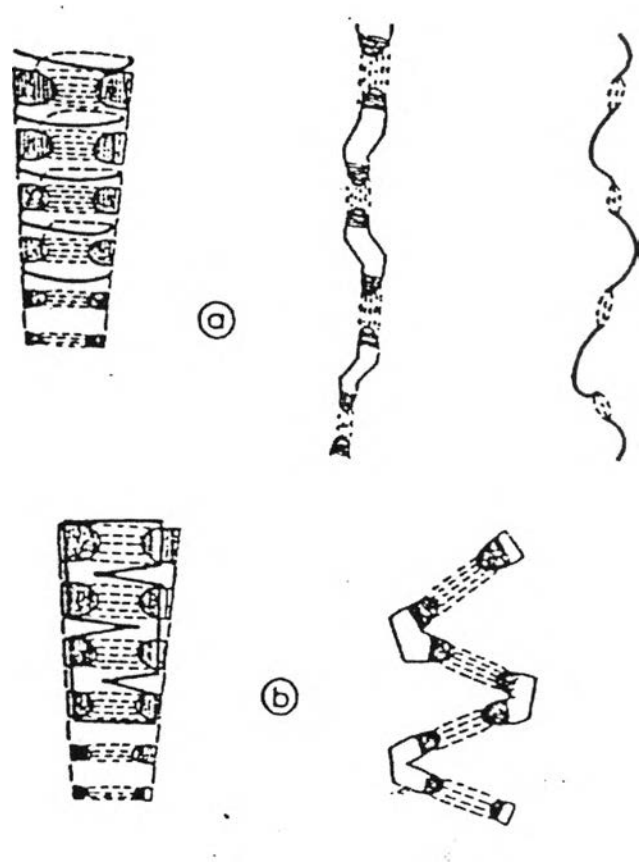
ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 ในน้ำ ที่ความเข้มข้น 50μg,100 μg, 200 μg, 400μg/ml ลงใน organ bath ที่มี หลอดเลือดแดงใหญ่ โดยให้สารห่างกัน 2 นาที โดยบันทึกผล 2 นาที เป็น control ให้ NE ขนาด $1x10^{-6}$ M นาน 2 นาที แล้วจึงให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่า บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมสารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 เปรียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง



5. **ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อการบีบตัวของหลอดลมของหนูตะเภา ที่แยกออกจากกาย** (isolated trachea) (n=8) (Wum-Chang Ko, 2002)

การเตรียมหลอดลมหนูตะเภา

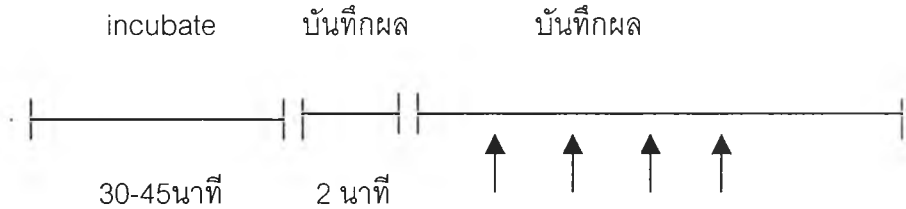
- ทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว ผ่าตัดเปิดช่องคอจนถึงช่องอก แยกตัดเอาหลอดลมออกมา โดยตัดให้ต่ำกว่ากล่องเสียงประมาณ 5 มิลลิเมตร และตัดให้มีความยาวของหลอดลมประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร นำหลอดลมที่แยกออกมาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย KHS และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ค่อยๆเลาะเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด แล้วแบ่งหลอดลมออกเป็น 2 ท่อน ท่อนยาวประมาณ 1 ซม. ใช้ทดลองได้ 2 ครั้ง ตัดหลอดลมเป็นแบบซิกแซก (Blattner et al ; 1980) แล้วใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน ด้านหนึ่งผูกกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 ml และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37± 0.5°C โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง แล้ว incubate หลอดลมนานประมาณ 45-60 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที



ภาพที่ 9 แสดงการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลม โดยการตัดแบบซิกแซก (zigzag)

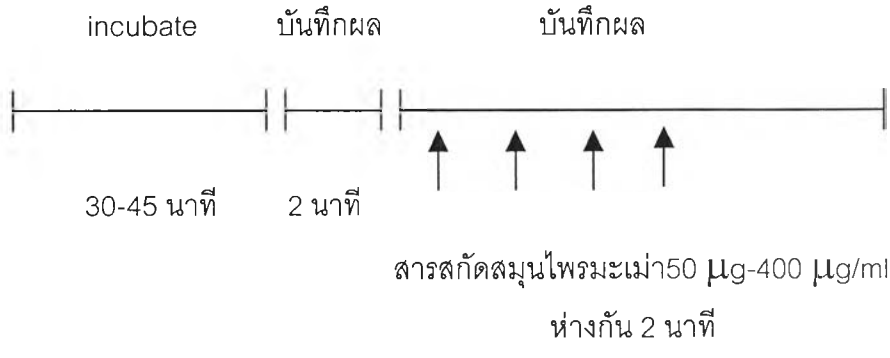
5.1 **ศึกษาผลของตัวทำละลาย** 5% tween 80 **ในน้ำ ต่อการบีบตัวของหลอดลมที่แยกออกจากกายหนูตะเภา** (isolated trachea) (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในน้ำขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดลมทุก ๆ 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง เมื่อ incubate 45-60 นาที จนกระทั่งหลอดลมมีแรงตึงตัวคงที่แล้ว บันทึกผล 2 นาทีเป็น control แล้วจึงให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในน้ำ ขนาด 0.1 ml ห่างกัน 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 5% Tween 80



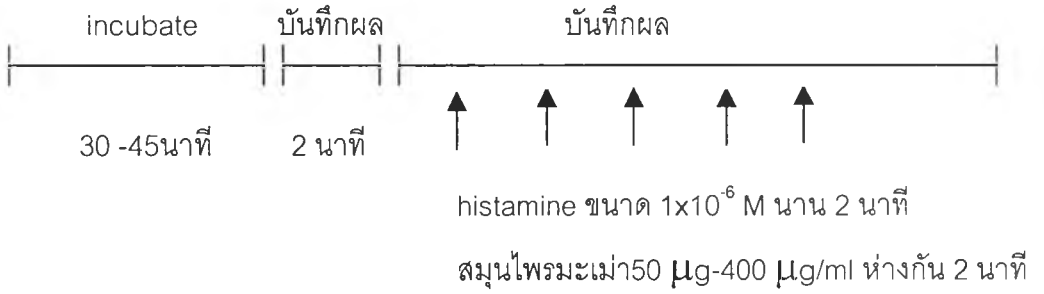
5.2 **ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ที่ละลายใน** 5% tween 80 **ในน้ำ ในขนาด** 50μg,100 μg, 200 μg, 400 μg/ml **ต่อการบีบตัวของหลอดลมที่แยกออกจากกายหนูตะเภา** (isolated trachea) (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 ในน้ำ ที่ความเข้มข้น 50μg, 100μg, 200μg, 400μg/ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดลมอยู่เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดลมมีแรงตึงตัวคงที่แล้วบันทึกผล 2 นาที เป็น control หลังจากนั้นให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าความเข้มข้น 50μg,100μg, 200μg, 400 μg/ml ปริมาณ 0.1 ml ห่างกัน 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง



5.3 **ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าต่อการบีบของหลอดลม ที่ถูกกระตุ้นด้วย histamine ขนาด 1x10^{-6} M ก่อนให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าในขนาด 50 μg,100 μg, 200 μg, 400 μg/ml ที่แยกออกจากกายหนูตะเภา** (Isolated Trachea) (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าที่ละลายใน 5% Tween 80 ในน้ำ ที่ความเข้มข้น 50μg, 100μg, 200μg, 400μg/ml ที่ถูกกระตุ้นด้วย histamineขนาด 1x10^{-6} M เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดลมมีแรงตึงคงที่แล้วบันทึกผล 2 นาที เป็น control แล้วจึงให้ histamineขนาด 1x10^{-6} M นาน 2 นาที หลังจากนั้นให้สารสกัดสมุนไพรมะเม่าขนาด 50μg, 100μg, 200μg, 400 μg/ml ใน organ bath ห่างกันทุก 2 นาที



การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

ผลการทดลองรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± standard Deviation)

ใช้สถิติ Student' s paired t – test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลต่อแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือด, ลำไส้, หัวใจ ,หลอดลม,ผลการตรวจโลหิต ก่อนและหลังการทดลอง

ใช้สถิติ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองจากผลของระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้สภาพปกติ, sleeping time,rotarod test