บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1.1 สัตว์ทดลอง

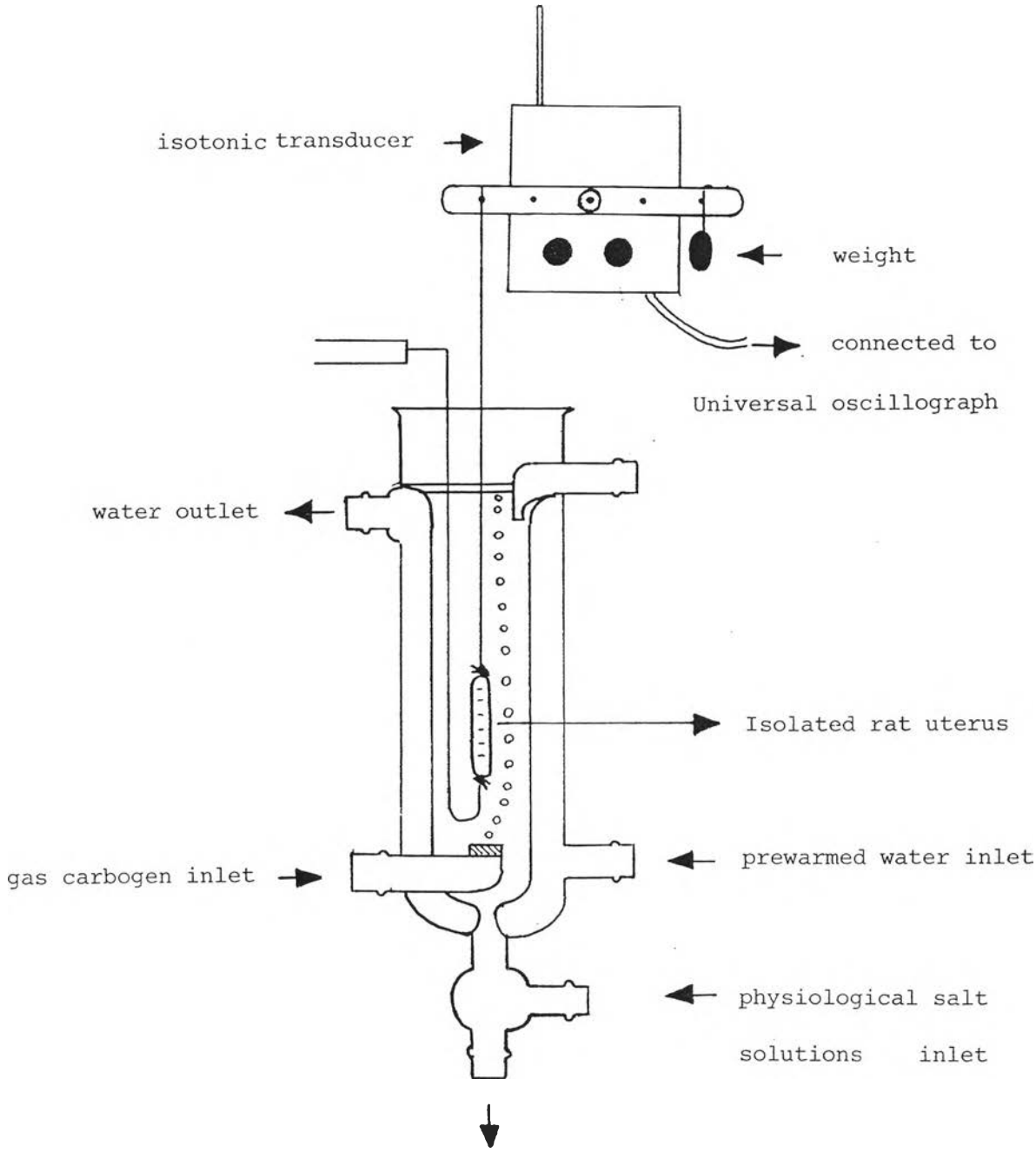
หนูขาว (rat) เพศเมีย น้ำหนัก 170-230 กรัม พันธุ์ Wistar จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

วิธีการเตรียมสัตว์ทดลอง

ฉีด estradiol valerate ภายใต้ชื่อการค้า"Progynon Depot" ขนาด 0.1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง 1 กิโลกรัม ทางชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ก่อนใช้ในการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 เครื่องมือ

- ชุด isolated organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological salt solutions) มีความจุ 20 มิลลิลิตร และมีช่องเปิดให้ก๊าซ carbogen (O_2 95 % + CO_2 5 %) ผ่านเข้าได้ ชั้นนอกมีน้ำอุ่นซึ่งส่งมาจาก water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ตลอดเวลา ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลองกับกล้ามเนื้อมดลูก ที่แยกจากกายหนูขาว (isolated rat uterus)

- Hetotherm water bath ของบริษัท Inter Med.

- เครื่องมือวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (isotonic transducer) ของบริษัท Harvard

- เครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลงความดัน (pressure transducer) ของบริษัท Harvard

- เครื่องบันทึกผลการทดลอง Universal oscillograph ของบริษัท Harvard

- เครื่องบันทึกผลการทดลอง พร้อมขยายสัญญาณไฟฟ้า รุ่น Gilson N2 (Holland) และของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals

- เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น A 200 S ของบริษัท Sartorius

- ถังบรรจุก๊าซ carbogen (O_2 95% + CO_2 5%) ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)

- ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก

1.3 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก

- oxytocin ภายใต้ชื่อการค้า "Syntocinon" ของบริษัท Sandoz , Switzerland.

- acetylcholine chloride (Sigma Chemical Co., St. Louis , U.S.A.)

- 5 - hydroxytryptamine creatinine sulfate complex (Sigma Chemical Co., St. Louis , U.S.A.)

- potassium chloride (Fluka AG , Buchs , Switzerland.)

- sodium orthovanadate (Sigma Chemical Co., St. Louis , U.S.A.)

- prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Sigma Chemical Co., St. Louis , U.S.A.)

2. สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ(physiological salt solutions)

- sodium chloride , D(+)-glucose monohydrate, sodium hydrogen carbonate , calcium chloride dihydrate (E.Merck , Darmstadt , Germany.)

- potassium chloride , Magnesium chloride hexahydrate (Fluka AG , Buchs , Switzerland.)

- ethylene glycol bis (ß-aminoethylether)- N, N ,N',N' - tetraacetic acid (EGTA) (Sigma Chemical Co., St. Louis , U.S.A.)

3. สารเคมีที่ใช้เตรียมสัตว์ทดลอง

- estradiol valerate ภายใต้ชื่อการค้า "Progynon Depot" ของบริษัท Schering , Germany.

4. สารเคมีที่ใช้เป็นยาสลบสัตว์ทดลอง

- pentobarbital sodium ภายใต้ชื่อการค้า"Nembutal" ของบริษัท Sanofi sante' , France.

5. สารเคมีที่ใช้ละลายสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก

- absolute ethanol (E. Merck , Darmstadt , Germany.)

1.4 สารทดลอง

สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก(Curcuma comosa Roxb.) สกัดโดย รศ. นิจศิริ เรืองรังษี ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีวิธีการสกัดโดย นำส่วนลำต้นใต้ดิน (เหง้า) ของว่านชักมดลูก มาแช่ในเอธานอล 95 % เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อแยกเอากากและตะกอนทิ้งไป แล้วนำสารละลายที่เหลือมาระเหยแยกเอาเอธานอลออก จะได้สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวหนืด สีน้ำตาลดำ มีกลิ่นฉุน นำมาใส่ขวดสีชาปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้ในการศึกษาทดลองต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก

ชั่ง "สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก" 200 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol จนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร นำมาใส่ขวดสีชาปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้ในการศึกษาผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกที่แยกจากกายหนูขาวต่อไป และเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

2.2 การเตรียมกล้ามเนื้อมดลูกหนูขาว (isolated rat uterus)

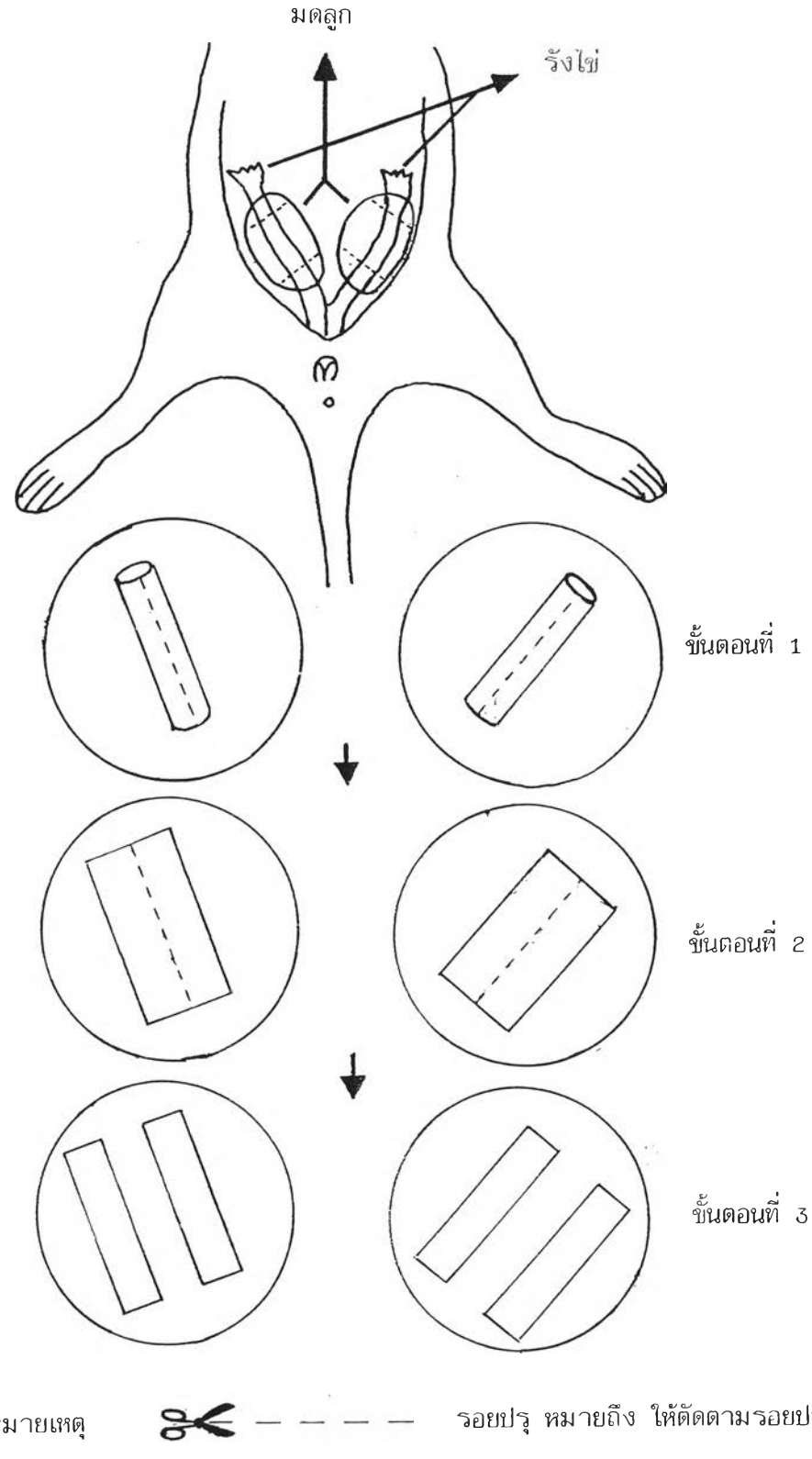
มีวิธีการเตรียมตามลำดับดังนี้คือ ทำให้หนูขาวหมดความรู้สึกโดยการทำให้กระดูกคอเคลื่อน (cervical dislocation) ผ่าตัดเปิดช่องท้อง ยกอวัยวะภายในช่องท้องขึ้นให้หมด จะเห็นหลอดมดลูก (uterus horns) อยู่ทั้งสองข้างของช่องท้องด้านล่าง ตัดหลอดมดลูกทั้งสองข้างออกมาแช่ใน petri dish ที่มีน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological salt solutions)อยู่และมีก๊าซ carbogen (O_2 95 % + CO_2 5 %) ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด แล้วตัดหลอดมดลูกแต่ละข้างให้มีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นผ่าตัดเปิด

หลอดมดลูกตามยาวจะได้แผ่นกล้ามเนื้อมดลูก (uterine strips) แล้วจึงตัดแบ่งแผ่นกล้ามเนื้อมดลูกตามยาวออกเป็นสองชิ้นเท่า ๆ กัน เมื่อทำตามวิธีที่กล่าวมานี้ จะได้แผ่นกล้ามเนื้อมดลูกที่จะใช้ในการทดลอง 4 ชิ้น ต่อสัตว์ทดลองหนึ่งตัว (Perry,1970) ดังแสดงในรูปที่ 6 ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองข้างของแผ่นกล้ามเนื้อมดลูก ปลายข้างหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปใส่ใน organ bath ที่มีน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่ออยู่ 20 มิลลิลิตร มีก๊าซ carbogen ไหลผ่านตลอดเวลา ยึดปลายแท่งพลาสติกติดกับ organ bath ให้แน่น ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งผูกติดกับเครื่องมือวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ (isotonic transducer) ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผลการทดลอง และเครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้าตามลำดับ เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อตามวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงตัว (resting tension) ตามที่ต้องการแล้ว equilibrate ไว้ประมาณ 45 - 60 นาที โดยเปลี่ยนน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อทุก ๆ 15 นาที แล้วจึงเริ่มทำการทดลองต่อไป

2.3 การศึกษาผลของสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย oxytocin 5×10^{-4} i.u./ml., acetylcholine 1×10^{-6} M., 5 - hydroxytryptamine 5×10^{-6} M. , potassium chloride 50 mM. ในน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแคลเซียม

การทดลองใช้น้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ De Jalon (ส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 1) ควบคุมอุณหภูมิที่ 32 ± 0.5 องศาเซลเซียส ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงตัว 1 กรัม

วิธีการทดลองทำโดย ให้สารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ De Jalon หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้พักจนกระทั่ง baseline คงที่



รูปที่ 6 แสดงวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อมดลูกหนูขาว (isolated rat uterus)

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ De Jalon

สารเคมี	จำนวนกรัม/ลิตร
NaCl	9.00
KCl	0.42
$CaCl_2$	0.06
$NaHCO_3$	0.50
Glucose	0.50
Aerating gas O_2 95 % + CO_2 5 %	
pH 7.8	

แล้วจึงให้สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูกขนาด 5 หรือ 10 μg./ml. ทิ้งไว้ 15 นาที จึงให้สารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกในขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก 15 นาที เปรียบเทียบผลการหดตัวก่อนและหลังได้รับสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก

2.4 การศึกษาผลของสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย oxytocin 1×10^{-2} i.u. / ml. , vanadate 1×10^{-4} M. และ prostaglandin $F_{2\alpha}$ 1×10^{-6} M. ในน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปราศจากแคลเซียม และมี EGTA

การทดลองใช้น้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ Locke Ringer และ Locke Ringer ที่ปราศจากแคลเซียมและมี EGTA (ส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 2) ควบคุมอุณหภูมิที่ 32 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส

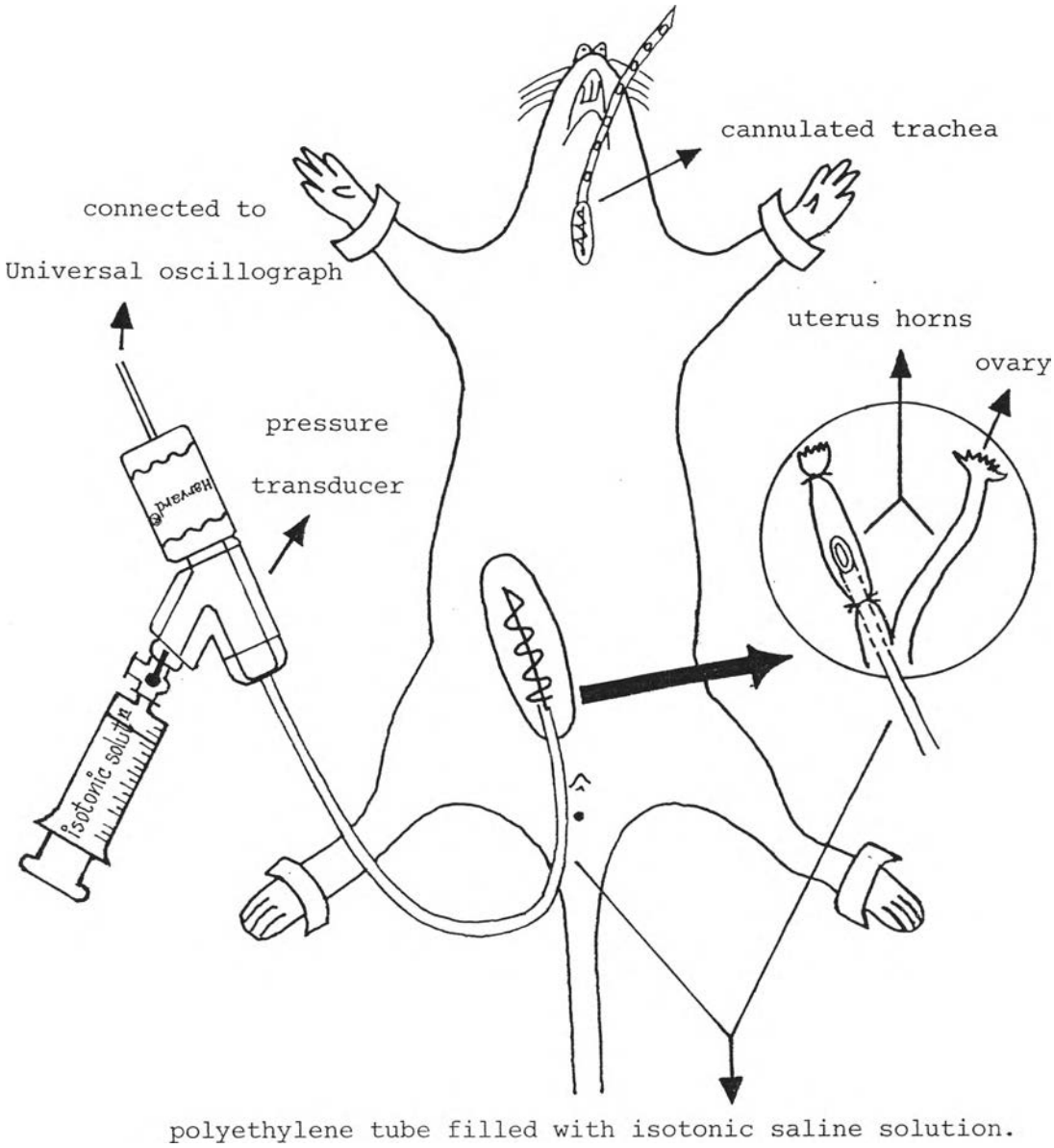
วิธีการทดลองทำโดย equilibrate กล้ามเนื้อมดลูกในน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ Locke Ringer ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงตัว 0.5 กรัม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น Locke Ringer ที่ปราศจากแคลเซียม และมี EGTA 3 mM. ปรับกล้ามเนื้อให้มีความตึงตัว 0.2 กรัม เป็นเวลา 50 นาที แล้วเปลี่ยนน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น Locke Ringer ที่ปราศจากแคลเซียม และมี EGTA 1 mM. เป็นเวลา 20-30 นาที จึงให้สารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก 10 นาทีหรือจนเกิดการหดตัวสูงสุด แล้วจึงให้สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก ขนาด 10 μg. / ml. บันทึกผลต่อไปอีก 30 นาที เปรียบเทียบผลการหดตัว ก่อนและหลังได้รับสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ Locke Ringer และ Locke Ringer ที่ปราศจากแคลเซียม และมี EGTA

สารเคมี	Locke Ringer (mM)	Locke Ringer ที่ปราศจากแคลเซียม และมี EGTA (mM)
NaCl	154.00	154.00
KCl	5.63	5.63
$CaCl_2$	2.16	-
$NaHCO_3$	5.95	5.95
$MgCl_2$	2.10	2.10
Glucose	5.55	5.55
EGTA	-	1 and 3
Aerating gas O_2 95 % + CO_2 %		

2.5 การศึกษาผลของสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก ต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดในตัวหนูขาว (intact rat uterus)

วิธีการทดลองทำโดยฉีด pentobarbital sodium (Nembutal) ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง 1 กิโลกรัม ทางผนังเยื่อบุช่องท้อง (intraperitoneal injection) เพื่อให้หนูสลบ จากนั้นผ่าตัดเปิดหลอดลม โดยใช้กรรไกรชลิบหลอดลมเล็กน้อย แล้วสอด polyethylene tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร เข้าหลอดลมใช้ด้ายมัดให้แน่น เพื่อป้องกันทางเดินหายใจอุดตัน แล้วผ่าตัดเปิดผนังช่องท้องด้านล่างขวาตรงบริเวณหลอดมดลูก เมื่อพบหลอดมดลูกข้างขวาแล้ว ใช้กรรไกรชลิบด้านที่ติดกับ vulva เล็กน้อย เพื่อสอดสาย polyethylene tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร ที่มี isotonic solution บรรจุอยู่เต็มเข้าไปภายในหลอดมดลูก ใช้ด้ายมัด polyethylene tube ติดกับหลอดมดลูกให้แน่น แล้วจึงผูกปลายด้านที่ติดกับรังไข่ให้เป็นกระเปาะ โดยที่ปลายของ polyethylene tube อยู่ภายในกระเปาะนั้น ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งของ polyethylene tube จะต่อเข้ากับเครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลงความดัน (pressure transducer) ซึ่งต่ออยู่กับเครื่องบันทึกผลการทดลอง และเครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้า ตามลำดับ จากนั้นจึงเย็บปิดผนังช่องท้อง ใช้ด้ายผูกยึด polyethylene tube ไว้ให้แน่น เมื่อเตรียมสัตว์ทดลองเสร็จเรียบร้อยแล้ว จะมีลักษณะเหมือนกับที่แสดงในรูปที่ 7 ฉีด isotonic solution เข้าไปเล็กน้อยจนมีแรงดันเกิดขึ้น ปล่อยให้พักประมาณ 30 นาที บันทึกผลการหดตัวในสภาพปกติ แล้วจึงให้ oxytocin ขนาด 1 i.u. ต่อน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง 1 กิโลกรัม ทางผนังเยื่อบุช่องท้อง บันทึกผลการหดตัว 30 นาที แล้วจึงให้สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก ขนาด 0.5 กรัม ต่อน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง 1 กิโลกรัม ทางผนังเยื่อบุช่องท้อง ทิ้งไว้ 30 นาที จึงให้ oxytocin ขนาดเท่าเดิมอีกครั้งหนึ่ง บันทึกผลการหดตัว 30 นาที เปรียบเทียบผลการหดตัวก่อนและหลังได้รับสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก ประกอบกับการศึกษาผลของสารสกัดด้วยเอธานอล



polyethylene tube filled with isotonic saline solution.

รูปที่ 7 แสดงการจัดเครื่องมือเพื่อใช้ในการทดลองศึกษาผลต่อการหดตัว ของมดลูกที่เกิดในตัวหนูขาว (intact rat uterus)

จากว่านชักมดลูก ต่อการหดตัวในขณะที่ oxytocin กำลังออกฤทธิ์ โดยให้ oxytocin ก่อนประมาณ 10-20 นาที แล้วจึงให้สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก เปรียบเทียบผลการหดตัวก่อนและหลังให้สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก

3. การวัดผลและการนำเสนอผลการวิจัย

1. เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย oxytocin 5 x 10^{-4} i.u./ml., Ach 1 x 10^{-6} M. , 5-HT 5 x 10^{-6} M. ในน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ De Jalon. (พิจารณาประกอบกับรูปที่ 8/A.)

การวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก จะแยกวัดเป็น 2 ลักษณะ คือ

1. วัดแรงในการหดตัวเฉลี่ย (mean force of contraction) มีค่าเท่ากับ

$$= \frac{\text{ผลรวมของแรงในการหดตัวทุกครั้ง ภายในเวลา 15 นาที}}{\text{จำนวนครั้งของการหดตัว ภายในเวลา 15 นาที}}$$

จากรูปที่ 8/A. มีค่า $= \frac{A + B + C + D + E + F + G}{7}$

2. ความถี่ในการหดตัว ภายใน 15 นาที (frequency) ซึ่งมีค่าเท่ากับ จำนวนครั้งของการหดตัว ภายในเวลา 15 นาที จากรูปที่ 8/A. มีค่า = 7 ครั้ง

การนำเสนอผลการวิจัย จะนำเสนอเป็น 3 รูปแบบ คือ

1. ร้อยละของแรงในการหดตัวเฉลี่ย
2. ร้อยละของความถี่ในการหดตัว ภายใน 15 นาที

3. ร้อยละของผลรวมในการหดตัว ภายใน 15 นาที โดยคิดจากการหดตัวที่เกิดขึ้นทั้งหมด (total of contraction) ภายในเวลา 15 นาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ [แรงในการหดตัวเฉลี่ย] x [ความถี่ในการหดตัว]

2. เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย KCl 50 mM. (พิจารณาประกอบกับรูปที่ 8/B.)

การวัดผลการหดตัว จะวัดแรงในการหดตัว ที่เวลา 15 นาที จากรูปที่ 8/B. มีค่า = A และนำเสนอผลการวิจัย ในรูปร้อยละของแรงในการหดตัว

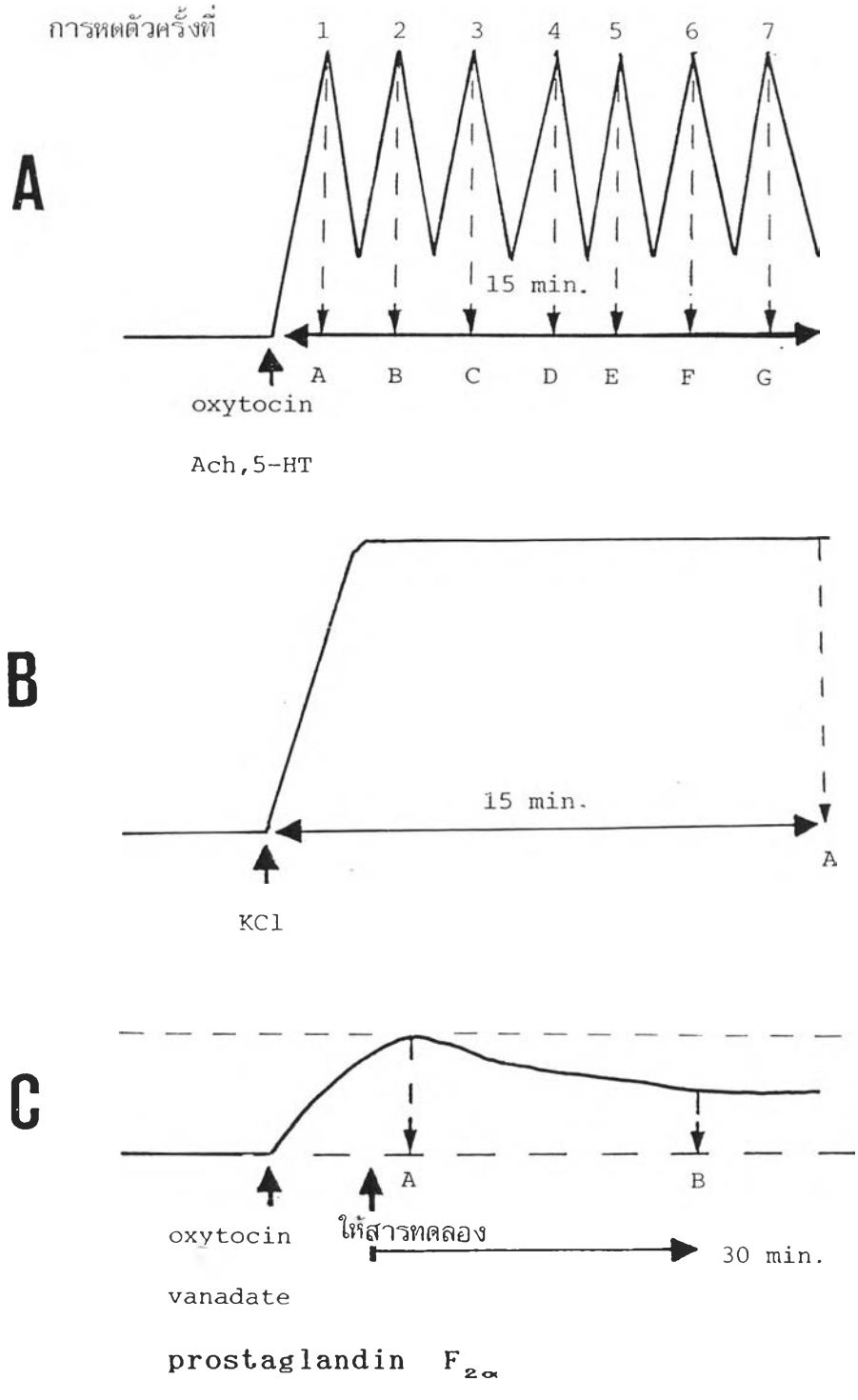
3. เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย oxytocin 1 x 10^{-2} i.u./ml. , vanadate 1 x 10^{-4} M., $PGF_{2\alpha}$ 1 x 10^{-6} M. ในน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปราศจากแคลเซียม (พิจารณาประกอบกับรูปที่ 8/C.)

การวัดผลการหดตัว จะวัดแรงในการหดตัวหลังให้ยา ประมาณ 30 นาที จากรูปที่ 8/C. มีค่า = B เปรียบเทียบกับแรงในการหดตัวสูงสุด (maximum of contraction) จากรูปที่ 8/C. มีค่า = A และนำเสนอผลการวิจัย ในรูปร้อยละของแรงในการหดตัว

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard error of mean)

การเปรียบเทียบความแตกต่าง ระหว่างผลการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกหนูขาว ก่อนและหลังได้รับสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก ใช้สถิติ student's paired t - test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)



รูปที่ 8 แสดงวิธีการวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกที่แยกจากกายหนูขาว (isolated rat uterus)

หมายเหตุ

รูป A และ B ทดลองใน De Jalon solution

รูป C ทดลองใน Ca^{2+}-free Locke Ringer solution