บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. พืชสมุนไพร

รากหนอนตายหยาก 2 ชนิด คือ *Stemona aphylla* Craib. จากจังหวัดลำปาง และ *Stemona* sp. จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน ซึ่งพืชทั้ง 2 ชนิด ได้นำไปส่งตรวจเอกลักษณ์ทางพฤกษศาสตร์เพื่อยืนยันชนิดของพืชและได้เก็บรักษาตัวอย่างพืชไว้ที่หอพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดย *S. aphylla* นั้น มี voucher number คือ 09 - 111 ส่วน *Stemona* sp. นั้นยังอยู่ในช่วงตรวจเอกลักษณ์ทางพฤกษศาสตร์อยู่

2. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar (*Rattus norvegicus*) อายุ 4 - 5 สัปดาห์ น้ำหนักระหว่าง 100 - 120 กรัม จำนวน 40 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากรากหนอนตายหยาก

3.1 เครื่องหั่นสมุนไพร

3.2 ตู้อบแห้งสมุนไพร

3.3 ขวดโหลแก้ว ขนาด 10 ลิตร

3.4 vacuum rotary evaporator

3.5 ขวดสีชา

3.6 เอทานอล 95%

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงและให้สารกับสัตว์ทดลอง

4.1 กรงสแตนเลสสำหรับเลี้ยงหนูทดลอง ขนาด 36 x 22 x 15 cm

4.2 ขวดน้ำพลาสติกพร้อมจุกยางและหลอดให้น้ำ

4.3 อาหารเม็ดสำเร็จรูป (C.P. mice feed) No. 082 จากบริษัทกรุงเทพอาหารสัตว์จำกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 ขี้เลื่อย

4.5 เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ตัดปลายให้ทู่ ลบคม แล้วทำให้โค้ง

4.6 สารสกัดรากหนอนตายหยากชนิดละ 2 ขนาด คือ 300 และ 500 mg/kgBW

4.7 น้ำกลั่น

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเก็บเนื้อเยื่อและซีรั่มของสัตว์ทดลอง

5.1 chloroform บริษัท Merck

5.2 โถสลบ

5.3 ชุดเครื่องมือผ่าตัด

5.4 กระบอกฉีดยาเพื่อเก็บเลือดจากหัวใจ

5.5 หลอดทดลอง

5.6 eppendorf ขนาด 1.5 ml

5.7 dropper

5.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Laboratory Centrifuge) ยี่ห้อ Gallenkamp, England

5.9 freezer - 40 ˚C ยี่ห้อ SANYO รุ่น MDF - U5410

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cholinesterase

6.1 0.1 M phosphate buffer saline, pH 8.0

6.2 0.2 mM DTNB (5, 5’ - dithiobis (2 - nitrobenzoic acid) บริษัท Sigma - Aldrich

6.3 0.75 mM acetylthiocholine iodide บริษัท Fluka

6.4 0.75 mM *S* - Butyrylthiocholine chloride บริษัท Sigma - Aldrich

6.5 น้ำกลั่น

6.6 เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AC 211S จาก Sartorius, USA

6.7 เครื่อง ELISA reader ยี่ห้อ Tecan Austria GmbH รุ่น 5082 Grödig, Austria

6.8 96 wells plate

6.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Heraeus รุ่น Biofuge haemo, Germany

6.10 homogenizer

6.11 freezer - 40 ˚C ยี่ห้อ SANYO รุ่น MDF - U5410

6.12 eppendorf

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.13 autopipette

6.14 หลอดทดลอง

7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลทางเนื้อเยื่อ

7.1 สไลด์สะอาดพร้อมแผ่นปิดสไลด์

7.2 ขวดเก็บตัวอย่าง

7.3 Bouin's fixative

7.4 alcohol ความเข้มข้นต่างๆ

7.5 xylene

7.6 paraffin เหลว

7.7 เครื่อง rotary microtome

7.8 hematoxylin

7.9 eosin

7.10 permount

7.11 staining jar

7.12 เข็มเขี่ย

7.13 น้ำประปา

7.14 น้ำกลั่น

7.15 กล้องจุลทรรศน์

8. สถานที่วิจัย

8.1 อาคารสัตว์ทดลอง และห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

8.2 หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ศูนย์บริการสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากรากหนอนตายหยาก

นำรากหนอนตายหยากมาล้างทำความสะอาดและหั่นด้วยเครื่องหั่นสมุนไพร ตากให้แห้งพอหมาด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 ˚C จนได้น้ำหนักแห้งคงที่ นำไปแช่ในเอทานอล 95% ในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งในขวดโหลนาน 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำมากรองเพื่อแยกกากออก จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 ˚C จนตัวทำละลายระเหยออกหมด เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 - 8 ˚C หรือนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 36 และ 60 mg/ml ตามลำดับ (เทียบได้กับขนาด 300 และ 500 mg/kgBW) เพื่อป้อนให้แก่หนูทดลองต่อไป

2. การเลี้ยงหนูทดลอง

ทำการชั่งน้ำหนักและเลี้ยงหนูทดลองในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 24 - 26 ˚C และให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ 06.00 - 18.00 น. และมืดตั้งแต่ 18.00 - 06.00 น. ให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำตามปกติตลอดระยะเวลาทำการทดลอง ซึ่งระบบเลี้ยงสัตว์ทดลองเป็นไปตามมาตรฐานการเลี้ยงสัตว์ทดลองของสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ภายใต้การกำกับของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หมายเลขอนุญาต Re. 001/10

3. การป้อนสารสกัดหนอนตายหยากให้หนูทดลอง

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว ทำการป้อนสารสกัดหนอนตายหยากให้แก่หนูทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* ขนาด 300 mg/kgBW

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *S. aphylla* ขนาด 500 mg/kgBW

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *Stemona* sp. ขนาด 300 mg/kgBW

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดรากหนอนตายหยากชนิด *Stemona* sp. ขนาด 500 mg/kgBW

กลุ่มที่ 5 ป้อนน้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาดของสารสกัดที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้อ้างอิงมาจากขนาดของสารสกัดจากพืชในสกุล *Stemona* ที่ได้มีการทดสอบถึงความเป็นพิษเรื้อรังในหนูขาวมาก่อนหน้านี้ (Pandee *et al*., 2003) จากนั้นทำการป้อนสารสกัดให้หนูเป็นเวลา 45 วัน โดยใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ของมือซ้ายจับต้นคอหนูและใช้นิ้วอื่นๆ ช่วยจับหนูให้แน่นหนูจะอยู่ในลักษณะที่เงยหน้าและอ้าปาก หลังจากนั้นป้อนสารสกัดลงไปในหลอดอาหารโดยไม่ป้อนลงในหลอดลมเพราะจะทำให้หนูสำลักสารตายได้

4. การเก็บตัวอย่างซีรั่ม เม็ดเลือดแดง เนื้อเยื่อตับ ไตและสมองของหนูทดลอง

หลังจากทำการป้อนสารแก่หนูทดลองครบ 45 วัน นำหนูทดลองมาทำให้หมดความรู้สึกด้วยคลอโรฟอร์ม ทำการเปิดช่องอกของหนูทดลอง แล้วใช้เข็มฉีดยาดูดเอาเลือดจากหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricle) โดยดูดออกมา 5 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ติดฉลากไว้เรียบร้อยแล้ว ตั้งหลอดเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 37 ˚C ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้เลือดแข็งตัว หลังจากนั้นนำเลือดที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนของซีรั่มและเม็ดเลือดแดงใส่ใน eppendorf เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ - 40 ˚C เพื่อนำไปตรวจสอบค่าของสารชีวเคมีต่อไป

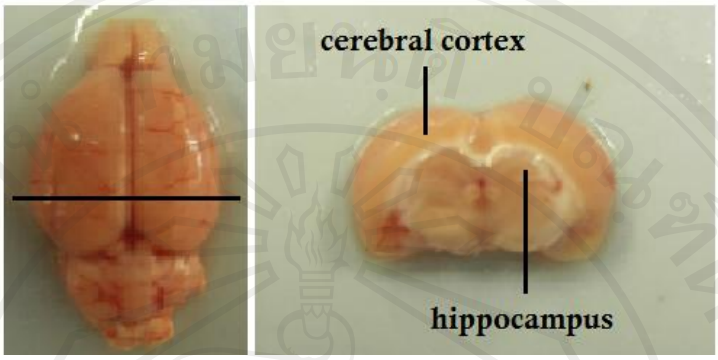
ทำการผ่าเปิดช่องท้องของหนูแล้วใช้กรรไกรตัดเก็บชิ้นส่วนของตับ และไต เพื่อนำไปศึกษาผลทางเนื้อเยื่อวิทยา จากนั้นทำการผ่าตัดเปิดกะโหลกของหนูจากทางด้านล่าง โดยเริ่มตัดเลาะผิวหนังและกล้ามเนื้อจากบริเวณหลอดลมขึ้นไปทางด้านหน้า (anterior) จากนั้นสอดกรรไกรเข้าไปในช่อง foramen magnum ตัดผ่านกระดูก basioccipital ของทั้งสองข้างของกะโหลกจนถึงกระดูก palatine แล้วเลาะกระดูกที่ตัดออกจนเห็นเนื้อสมอง คว้านก้อนสมองออกมาวางบนจานแก้ว ที่วางอยู่บนน้ำแข็ง จากนั้นแบ่งสมองออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนด้านหน้า (anterior part) นั้นนำมาตัดแยกสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus (ภาพ 14) เก็บไว้ที่ ที่ - 40 ˚C เพื่อนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ChE ส่วนสมองด้านท้าย (posterior part) นั้นแช่ลงในน้ำยาคงสภาพ Bouin's fixative เพื่อนำไปตรวจสอบผลทางเนื้อเยื่อต่อไป

5. การตรวจสอบค่าชีวเคมีของตับและไต

นำซีรั่มที่เตรียมได้จาก ข้อ 4. มาตรวจสอบค่าชีวเคมีที่บ่งชี้การทำงานของตับได้แก่ ALT, AST และ ALP ส่วนการทำงานของไตนั้นได้ตรวจสอบจากระดับ creatinine และ BUN โดยการตรวจสอบผลของค่าชีวเคมีคลินิกเหล่านี้ได้ทำการส่งตรวจที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ศูนย์บริการสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้เครื่อง automated photometric systems



ภาพ 14 สมองของหนูขาวแสดงส่วน cerebral cortex และ hippocampus

6. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cholinesterase

6.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อสมอง เม็ดเลือดแดง และซีรั่ม

นำเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus 20 mg และเม็ดเลือดแดง 20 µl มาบดให้ละเอียดใน 0.1 M phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 1 ml ผสมซีรั่มปริมาตร 20 µl เข้ากับ 0.1 M PBS ปริมาตร 1 ml หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ - 40 ˚C และทำการทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง

6.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cholinesterase

การวัดกิจกรรมของ ChE เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ellman *et al.* (1961) โดยเริ่มจากผสมเนื้อเยื่อสมอง เม็ดเลือดแดง และซีรั่มที่เตรียมได้จากข้อ 6.1 ปริมาตร 130 µl กับ 0.2 mM DTNB 1,300 µl และ 0.75 mM acetylthiocholine iodide หรือ *S* - butyrylthiocholine chloride ปริมาตร 63 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดออกมา 250 µl ใส่ใน 96 wells plate นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA ที่ความยาวคลื่น 405 nm ทุกๆ 2 นาที นาน 10 นาที จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมของ ChE เทียบกับกลุ่มควบคุม (รายละเอียดในภาคผนวก)

7. การศึกษาผลทางเนื้อเยื่อวิทยาของตับ ไต และสมอง

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อตับ ไต และสมอง ที่ได้เตรียมไว้มาตรึงด้วยน้ำยาคงสภาพ Bouin's fixative จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วย alcohol ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื้อเยื่อใสด้วย xylene และนำไปฝังใน paraffin จากนั้นนำมาตัด section ด้วยเครื่อง Rotary microtome ให้ได้ section หนา 6 ไมโครเมตร วางลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด นำ section ที่ตัดได้ไปย้อมสีด้วย Hematoxylin & Eosin แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อตัวอย่าง

8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิธีวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ในโปรแกรม SPSS for Windows version 16 ในการแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (Mean ± Standard deviation)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved