บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือและสารเคมี

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

หนูขาว (Wistar rats) เพศผู้ น้ำหนัก 200-350 กรัม

หนูถีบจักร (Swiss albino mice) เพศผู้ น้ำหนัก 25-30 กรัม

หนูตะเภา (Guinea pigs) เพศผู้ น้ำหนัก 300-400 กรัม

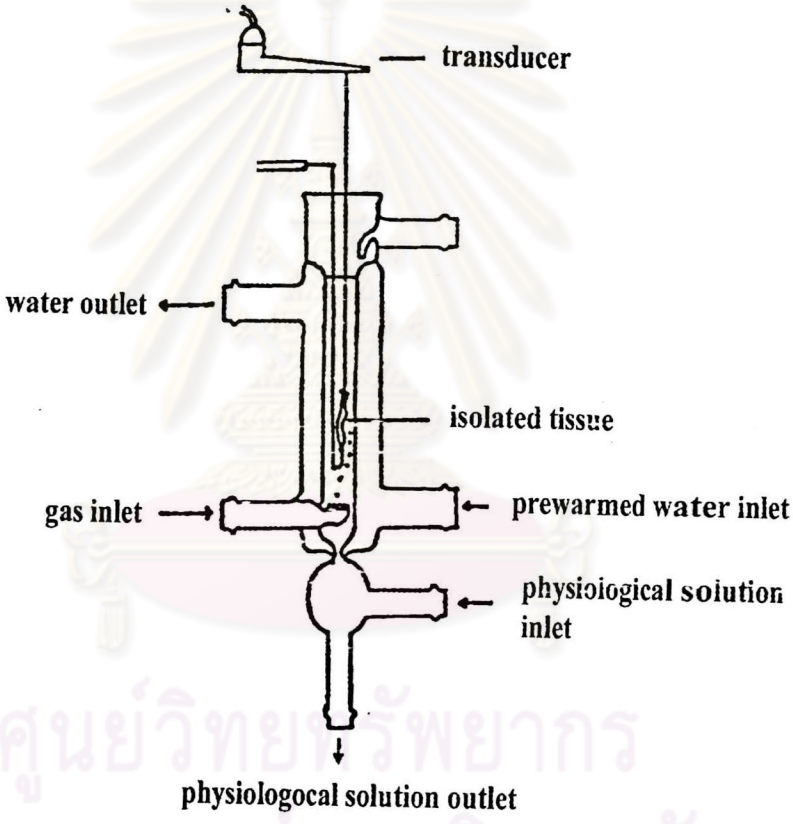
การขนส่งสัตว์ทดลองจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา กิ่ง อ.พุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม มายังศูนย์สัตว์ทดลอง ตึกสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปฏิบัติตามมาตรฐานการขนส่งสัตว์ทดลอง สัตว์ทดลองจะถูกนำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$C มีแสงสว่างพอเหมาะ และ เลี้ยงในกรงที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป CP 082 mice feed และได้รับน้ำอย่างเพียงพอตามความต้องการ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำมาทำการทดลอง เพื่อให้สัตว์ทดลองได้ปรับสภาพร่างกายและ สิ่งแวดล้อม

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 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$C โดยมีเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoregulating water pump)เป็นตัวส่งน้ำและควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่อง Rotarod (Med associates INC. Georgia ,Vermont)
- เครื่องบันทึกผล (Recorder) รุ่น Biopac Lab Pro MP100
- Water bath พร้อมเครื่อง Thermoregulating water pump
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด รุ่น Precisa 404 MSCS

- วัสดุจำเป็นอื่นๆ

  - ถังบรรจุก๊าซ carbogen (O_2 95 %+CO_2 5%)
  - ชุดผ่าตัดเล็ก
  - กรรไกร
  - Syringe + tubeป้อนยา (Feeding tube)



ภาพที่ 3 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่แยกออกจากกาย (Isolated organ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **สารเคมี** ที่ใช้เตรียมสารละลาย Krebs-Henseleit จากบริษัท Merch K GaA , Darmstadt ,Germany.

- Glucose
- Sodium chloride (NaCl)
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- Potassium chloride (KCl)
- Magnesium sulphate ($MgSO_4$)
- Magnesium chloride ($MgCl_2$)
- Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)
- Calcium chloride ($CaCl_2$)

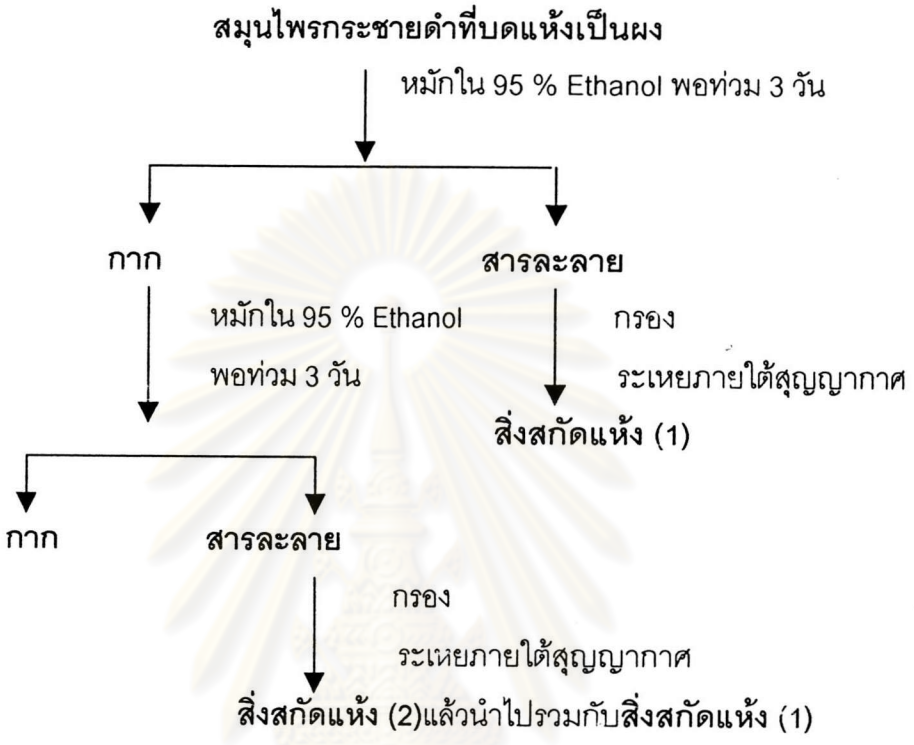
4. **สารมาตรฐาน** (Standard)

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

การเตรียมสารทดสอบ (Test compound)

1.) กระชายดำ ที่เลือกศึกษาคือ *Kaempferia parviflora* wall.ex.baker ซึ่งเก็บจาก จ.เพชรบูรณ์ ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2546 นำตัวอย่างพืชมาอบแห้งในตู้อบภายใต้อุณหภูมิไม่เกิน 60°C เป็นเวลานาน 3 วัน แล้วนำไปบดจนละเอียด จากนั้นนำมาหมักใน 95%ethanol พอท่วมหรือประมาณ 5 เท่า (w/v) ของน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 3 วัน นำสารละลายที่ได้มากรอง แล้วระเหยจนแห้งภายใต้สุญญากาศจนได้สิ่งสกัดแห้ง ส่วนกากที่เหลือนำไปหมักต่อด้วย 95%ethanol เช่นเดิมอีกเป็นเวลาอีก 3 วัน นำสารละลายที่ได้มากรอง แล้วระเหยจนแห้งภายใต้สุญญากาศรวมกับสิ่งสกัดแห้งที่ได้ในครั้งแรก (ตามแผนภูมิที่ 1) จะได้สารสกัดแอลกอฮอล์เป็น crude extract มีลักษณะกึ่งเหลว เหนียวหนืด สีดำน้ำตาล ใส่สารสกัดในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิท โดยมีการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางกายภาพ และ เคมี ใส่สารสกัดในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิท โดยมีการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางกายภาพ และ เคมี แสดงถึงคุณลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพ (quality specification)

และควบคุมคุณภาพ โดยตรวจด้วยวิธี chromatography ทั้ง Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้ chromatogram แสดงลักษณะของส่วนประกอบในสิ่งสกัด (fingerprint)



แผนภูมิที่ 1 แสดงการเตรียมสิ่งสกัดจากสมุนไพรกระชายดำ

วิธีการเตรียมสารสกัดกระชายดำเพื่อใช้ในการทดสอบ

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในการศึกษาครั้งนี้ คือ 5% Tween 80

2. การศึกษาครั้งนี้ เราเลือกขนาดของสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบโดยใช้ขนาดที่มีการใช้ในคน คือ 250-500 mg/kg ต่อวัน , ขนาดครึ่งเท่า และ 2 เท่าที่ใช้รับประทานในคนมาใช้ในการศึกษา โดยเตรียมสารละลายของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่จะให้สัตว์ทดลองในขนาด 8 mg , 40 mg และ 200 mg/Kg/BW และเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำให้ได้ความเข้มข้นขนาด 4 μg, 20 μg,100 μg ,500 μg/ml เพื่อใช้ในการทดลอง isolated tissue โดยดูตัวอย่างการคำนวณด้านล่าง

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ

1. สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ใช้ขนาดสูงสุด 200 mg/kg/BW

   ปริมาณที่ให้ในสัตว์ทดลอง 200 mg/ kg

   ปริมาณที่เตรียม 5 ml ต้องใช้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำจำนวน $\frac{200 \times 5}{1000}$

   = 1 g / 5 ml

นำสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ 1 g มาละลายใน 5% Tween 80 แล้วปรับปริมาณให้ได้ 5 ml แล้วนำมาเจือจางให้ได้ตามความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการ

2. ความเข้มข้นของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ใช้ใน organ bath ขนาด 25 ml

   จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

   ปริมาณที่ใส่ใน organ bath = 0.1 ml (100 µl)

   ความเข้มข้นสูงสุดใน organ bath = 500 µg / ml

   $N_1 \times 100$ (µl) = 500 µg/ml x25000 (µl)

   $\frac{500 \times 25000}{100}$ = 125,000 µg /100 (µl)

   = 0.125 g/0.1 ml

   = 125 mg/0.1 ml

โดย N_1 = ความเข้มข้นของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่นำมาใช้

V_1 = ปริมาณของสารสกัดแอลกอฮอล์ระชายดำที่เตรียมในตัวทำละลาย

N_2 = ความเข้มข้นของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำใน organ bath (25ml)

V_2 = ปริมาณของน้ำยาหล่อเลี้ยงเลี้ยงเนื้อเยื่อใน organ bath (25 ml)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

ระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal system)

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อลำไส้เล็กของหนูขาว โดยดูการเคลื่อนที่ของผงถ่าน (charcoal) (n=8) (พิณรัตน์ 2533)

วิธีการทดลอง

1.) การเตรียมผงถ่าน (charcoal) โดยใช้ Tragacanth ซึ่งเป็นสารช่วยแขวนตะกอนผงถ่าน โดยการบด Tragacanth 2 กรัม และ ผงถ่าน 12 กรัมกับน้ำ มาละลายให้เข้ากันในโกร่งกระเบื้องเคลือบโดยเติมน้ำทีละน้อยๆ และปรับปริมาตรให้ได้ 130 ml

2.) เตรียมหนูขาวโดยให้อดอาหารก่อนการทดลอง 14-16 ชั่วโมง ดื่มน้ำได้ตามความต้องการ

แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม (n=8) แล้วให้สารสกัดทางปากโดยใช้ feeding tube

กลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำกลั่น จำนวน 1 ml/kgBW

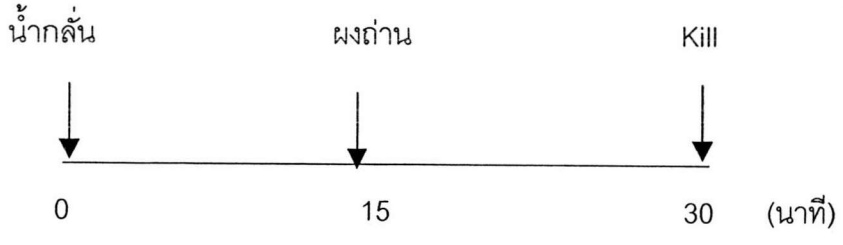
กลุ่มที่ 2 ได้รับสาร 5%Tween80 จำนวน 1 ml/kgBW

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำขนาด 8 mg/kgBW

กลุ่มที่ 4 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำขนาด 40 mg/kgBW

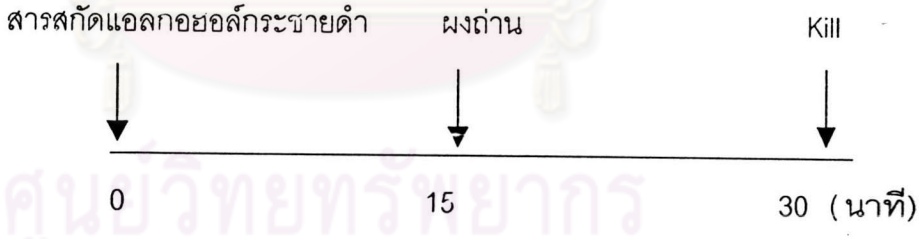
กลุ่มที่ 5 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำขนาด 200 mg/kgBW

3.) กลุ่ม A เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น 1 ml/kgBW โดยใช้ feeding tube หลังจากนั้น 15 นาทีนำมาป้อนผงถ่านปริมาตร 0.5 ml เข้าทางปาก เมื่อครบเวลา 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวโดยวิธีทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว เปิดช่องท้องนำลำไส้เล็กออกจากช่องท้อง วางบนแผ่นพลาสติกที่มีกระดาษกราฟรอง วัดความยาวทั้งหมด และ วัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็ก โดยเปรียบเทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัวแสดงค่าการเคลื่อนที่ของผงถ่านเป็นร้อยละ



4.) กลุ่ม B ได้รับ สาร 5%Tween80 ขนาด 1 ml/kg/BWเว้นระยะ 15 นาที ป้อนผงถ่านปริมาตร 0.5 ml เข้าทางปาก เมื่อครบเวลา 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวโดยวิธีทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว เปิดช่องท้องนำลำไส้เล็กออกจากช่องท้อง วางบนแผ่นพลาสติกที่มีกระดาษกราฟรอง วัดความยาวทั้งหมด และ วัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็ก โดยเปรียบเทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัวแสดงค่าการเคลื่อนที่ของผงถ่านเป็นร้อยละ

5.) กลุ่มทดลองได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำขนาด 8 mg , 40 mg , 200 mg/kgBW ในสารละลาย 5%Tween80 เว้นระยะ 15 นาที ป้อนผงถ่านปริมาตร 0.5 ml เข้าทางปาก เมื่อครบเวลา 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวโดยวิธีทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว เปิดช่องท้องนำลำไส้เล็กออกจากช่องท้องวางบนแผ่นพลาสติกที่มีกระดาษกราฟรอง วัดความยาวทั้งหมด และวัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็ก โดยเปรียบเทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัวแสดงค่าการเคลื่อนที่ของผงถ่านเป็นร้อยละ

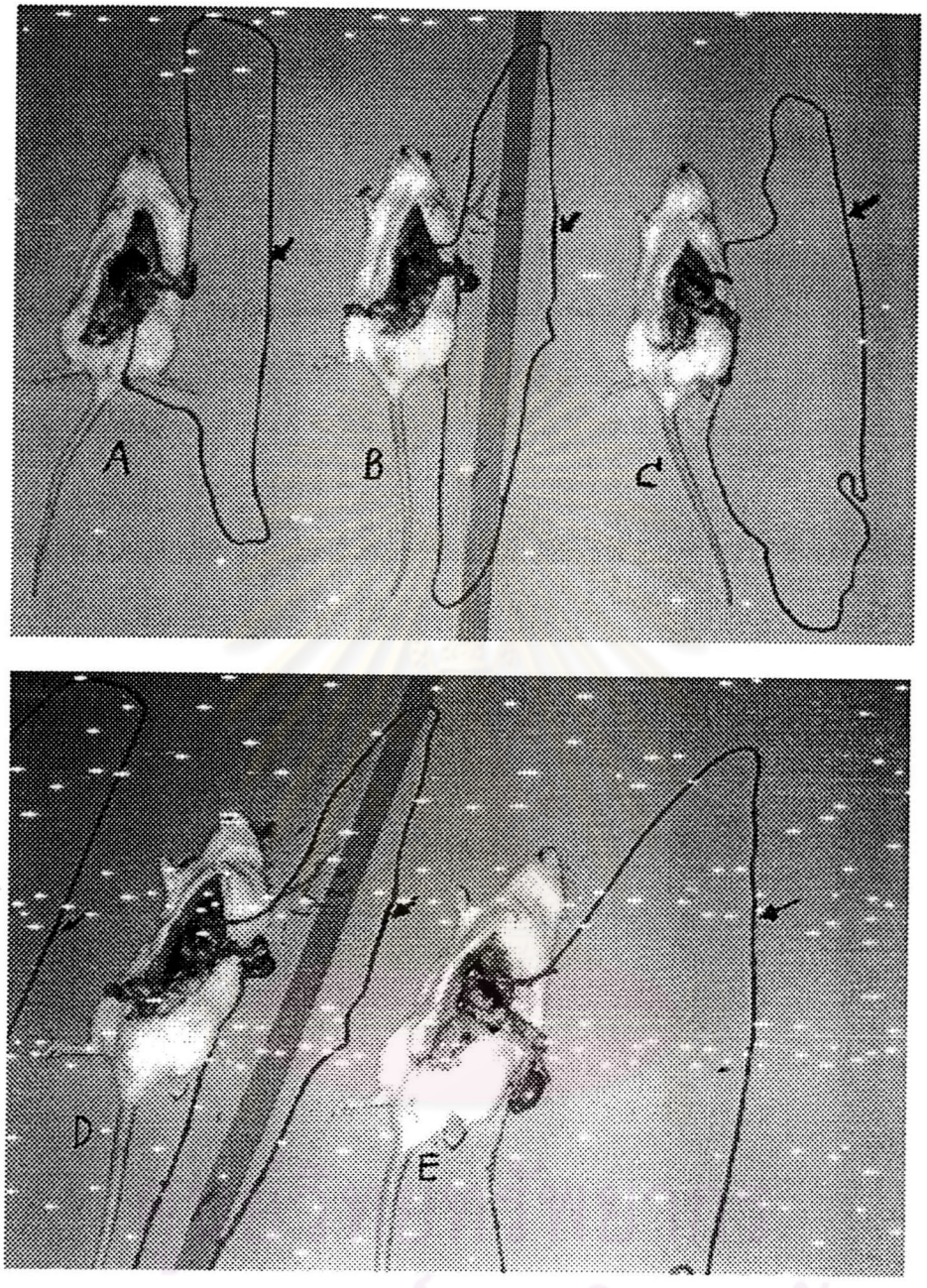


6.) นำเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในทุกกลุ่มเปรียบเทียบกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 แสดงการป้อนสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำเข้าทางปากของหนูขาว โดยใช้ feeding tube (ปานเทพ,2535)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 5 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ไปของผงถ่านในลำไส้ของหนูขาวสภาพปกติภายหลังการได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำทางปาก (p.o.) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (อุษณีย์,2546)

A = กลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำกลั่น จำนวน 1 ml/kg/BW

B = กลุ่มที่ 2 ได้รับ 5 % Tween 80 ในน้ำ จำนวน 1 ml/kg/BW

C = กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 8 mg/kgBW

D = กลุ่มที่ 4 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 40 mg/kgBW

E = กลุ่มที่ 5 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 200 mg/kgBW

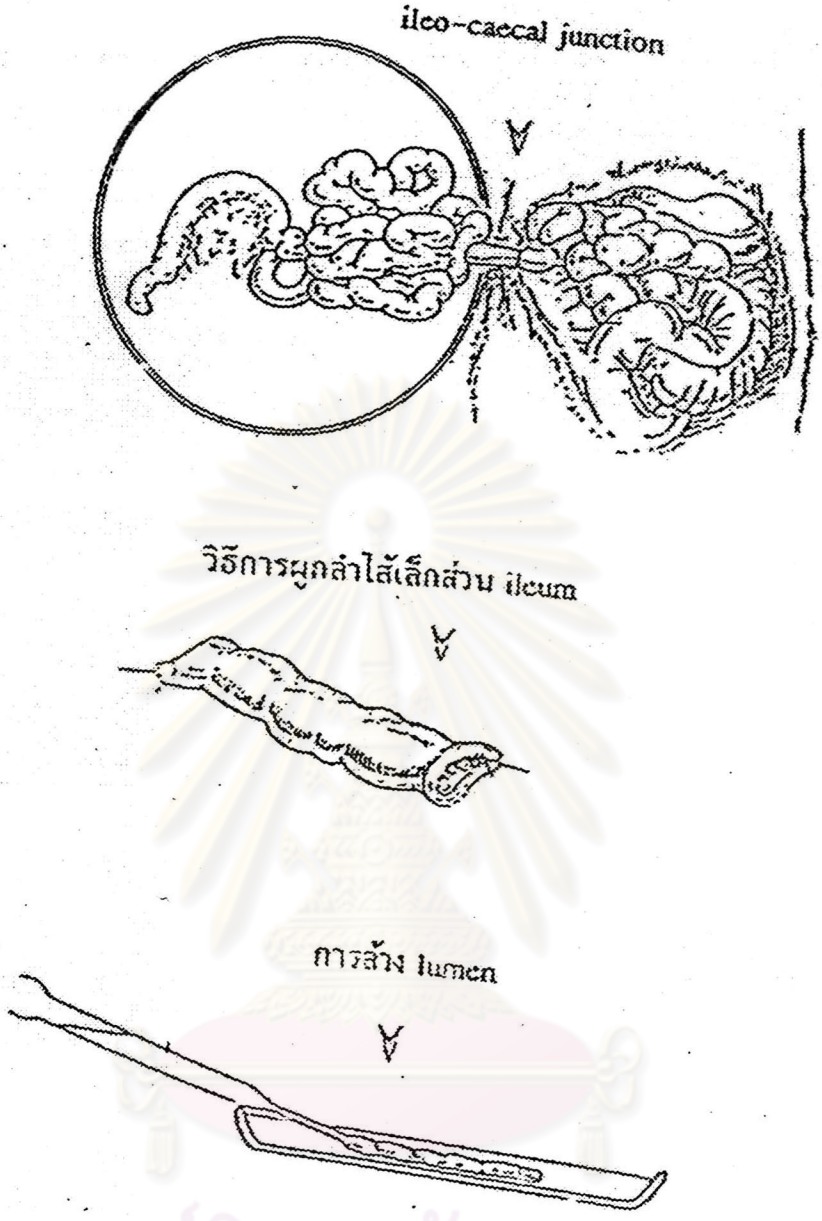
การทดลองที่ 1.2 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อลำไส้เล็กส่วนileumที่แยกออกจากกายหนูขาว (isolated ileum)(n=8) (Blattner et al;1980)

วิธีการทดลอง

1.) เตรียมหนูขาว โดยให้อดอาหารก่อนการทดลอง 14-16 ชั่วโมงให้ดื่มแต่น้ำ

2.) ทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว ผ่าท้องเอาลำไส้เล็กส่วน ileum มาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs - Henseleit solution (KHS) และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างลำไส้ด้านในด้วยสารละลาย KHS ตัดแบ่งลำไส้เป็นท่อนยาวประมาณ 1 ซม. ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้าง โดยให้ปลายทั้งสองด้านเปิดเพื่อให้สารละลาย KHS ผ่านได้ ผูกปลายอีกด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37$\pm$ 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 เพื่อให้กล้ามเนื้อปรับตัวให้มีความคุ้นเคยกับสภาวะใน organ bath และ มีการเคลื่อนไหวได้เอง (spontaneous movement) ทำการบันทึกการเคลื่อนไหวหรือความถี่ในการหดตัว และความสูงของการหดตัวเพื่อใช้เป็นค่าควบคุม (control)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

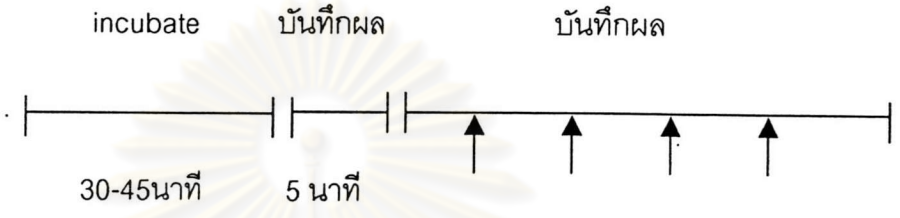


ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งลำไส้เล็กส่วน iieum และการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว (W.L.M. Perry,1968)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% Tween 80 ต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว (n=8)

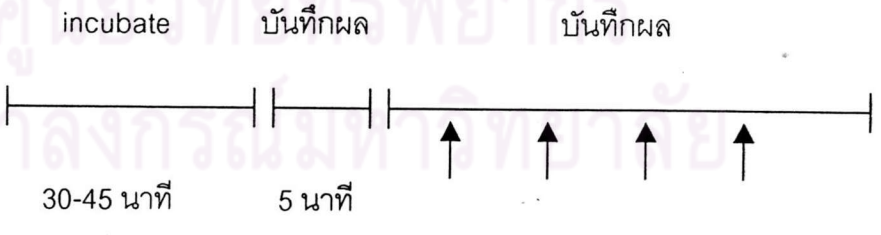
ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% Tween 80 ที่ให้แบบสะสม เมื่อ incubate จนกระทั่งลำไส้เล็กส่วน ileum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กส่วน ileum ทุก 5 นาที จำนวน 4 ครั้ง นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



5% Tween 80 ขนาด 0.1 ml ทุก 5 นาที

1.2.2 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 ในขนาด 4 μg, 20 μg, 100 μg, 500 μg/ml ใน organ bath ต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว (n=8)

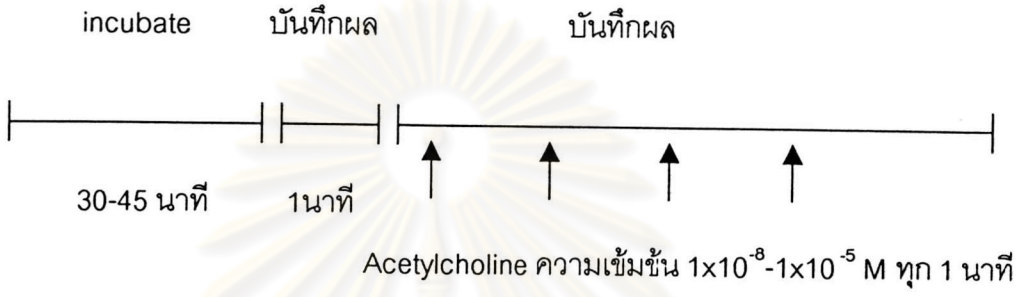
ศึกษา cumulative dose-response curve ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 เมื่อ incubate จนกระทั่งลำไส้เล็กส่วน ileum มีการทำงานที่คงที่แล้วบันทึกผล 5 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 ที่ความเข้มข้น 4 μg, 20 μg, 100 μg, 500 μg/ml จำนวน 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ4 μg - 500μg/ml
ทุก 5 นาที

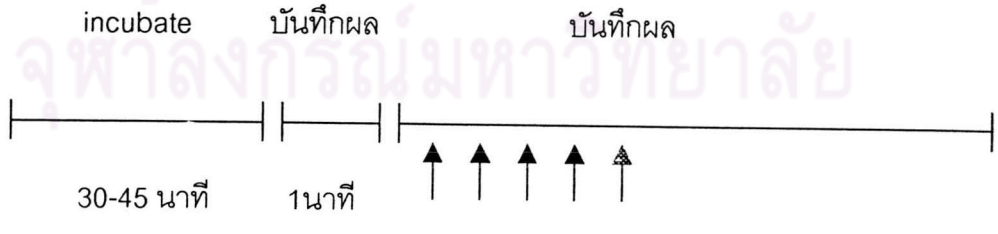
1.2.3 ศึกษาผลการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว ที่ถูกกระตุ้นด้วย Acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของ Acetylcholine ในลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อ incubate จนกระทั่งลำไส้เล็กส่วน ileum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01ml ลงใน organ bath ทุก 1 นาที เปรียบเทียบกับผลก่อนการทดลอง



1.2.4 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว ที่ถูกกระตุ้นด้วย Acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ก่อนให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 100 μg/ml (n=8)

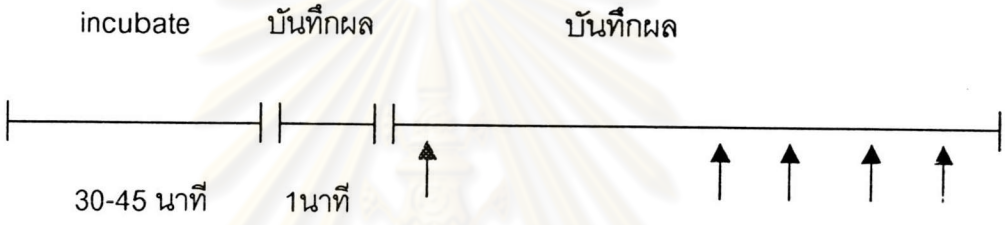
ศึกษา cumulative dose-response curve ของลำไส้เล็กต่อ Acetylcholine ร่วมกับได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ เมื่อ incubate จนกระทั่งลำไส้เล็กส่วน ileum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Acetylcholine ความเข้มข้น 1×10^{-8} -$1x10^{-5}$ M ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กส่วน ileum ทุก 1 นาที หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 100μg/ml ทิ้งไว้ 15 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ 1 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.5 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว ที่ถูกกระตุ้นด้วย Acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M หลังให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 100 μg/ml (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของลำไส้เล็กที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำร่วมกับ Acetylcholine เมื่อ incubate จนกระทั่งลำไส้เล็กส่วน ileum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control แล้วจึงให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 100μg/ml จำนวน 0.1 ml ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นทำการกระตุ้นด้วย Acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01 ml ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กส่วน ileum ทุก 1 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ 1 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



ให้สารสกัดกระชายดำ 100 μgทิ้งไว้ 15 นาที แล้วให้ Acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ทุก 1 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system)

2.1 ศึกษาการเสริมฤทธิ์การนอนหลับของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ให้ร่วมกับ pentobarbital sodium ทางช่องท้อง (i.p.) โดยการบันทึกเวลาที่สูญเสีย righting reflex (n=8) (Thomson, 1990)

1.) ชั่งน้ำหนักหนูถีบจักรแต่ละตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (n=8) คือ

กลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำกลั่น จำนวน 1 ml/kg/BW

กลุ่มที่ 2 ได้รับสาร 5%Tween80 จำนวน 1 ml/kg/BW

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ ขนาด 8 mg/kg/BW

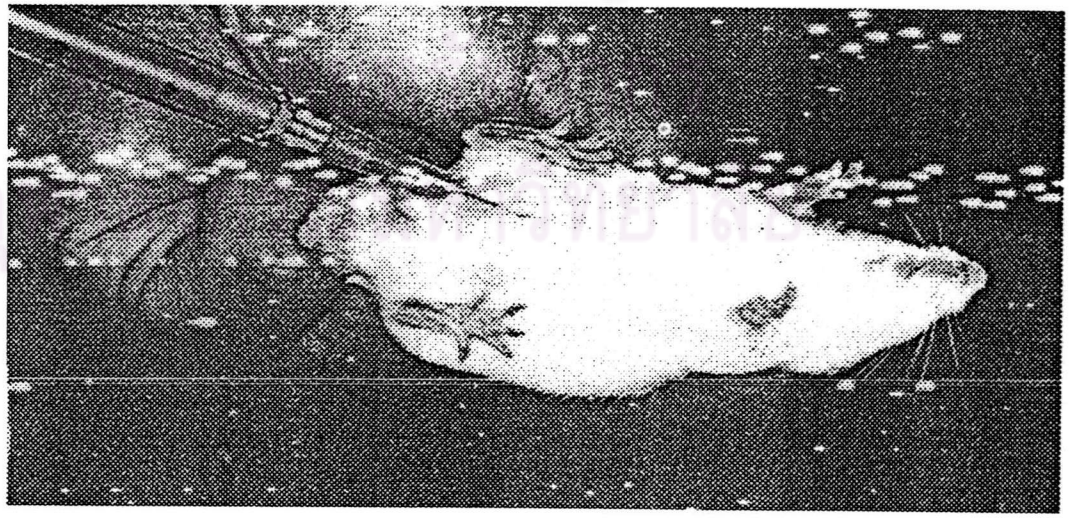
กลุ่มที่ 4 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ ขนาด 40 mg /kg/BW

กลุ่มที่ 5 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ ขนาด 200 mg /kg/BW

2.) หลังจากได้รับสาร 5%Tween80 และสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำตามขนาดที่กำหนดตามกลุ่ม หลังจากนั้นฉีด pentobarbital sodium ขนาด 60 mg/kgBW (i.p.) ทันที (ปานเทพ, 2533)

3.) ตรวจการสูญเสีย righting reflex ของหนูแต่ละตัว โดยจับหนูนอนหงายแล้ว หนูไม่สามารถพลิกตัวกลับมาเหมือนเดิม (สูญเสีย righting reflex) บันทึกเวลาตั้งแต่ให้สารทดสอบ จนหนูสูญเสีย righting reflex สมบูรณ์ และ righting reflex กลับคืนมาสมบูรณ์ บันทึก onset of action และ duration of action

4.) เปรียบเทียบผลการทดลองในหนูแต่ละกลุ่ม



ภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งการฉีดเข้าทางช่องท้อง (ip) ของหนูถีบจักร (ปานเทพ,2535)

2.2 **ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อ motor co-ordination โดยการทำ Rotarod test (Mayuree H.Tantisira,1997 และ** Dunham and Miya,1957) (n=8)

1.) ทำการทดลองโดยให้หนูถีบจักรเดินบน Rotating bar ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 ซม.หมุน 16.5 รอบ /นาที ก่อนทำการทดลอง โดยหนูถีบจักรที่สามารถเดินบน Rotating bar ได้อย่างน้อย 1 นาที จะนำมาทำการศึกษาในการทดลองนี้

2.) ชั่งน้ำหนักหนูถีบจักรแต่ละตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (n=8) คือ

กลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำกลั่น จำนวน 1 ml/kg/BW (i.p.)

กลุ่มที่ 2 ได้รับสาร 5%Tween8 จำนวน 1 ml/kg/BW (i.p.)

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ ขนาด 8 mg /kg/BW (i.p.)

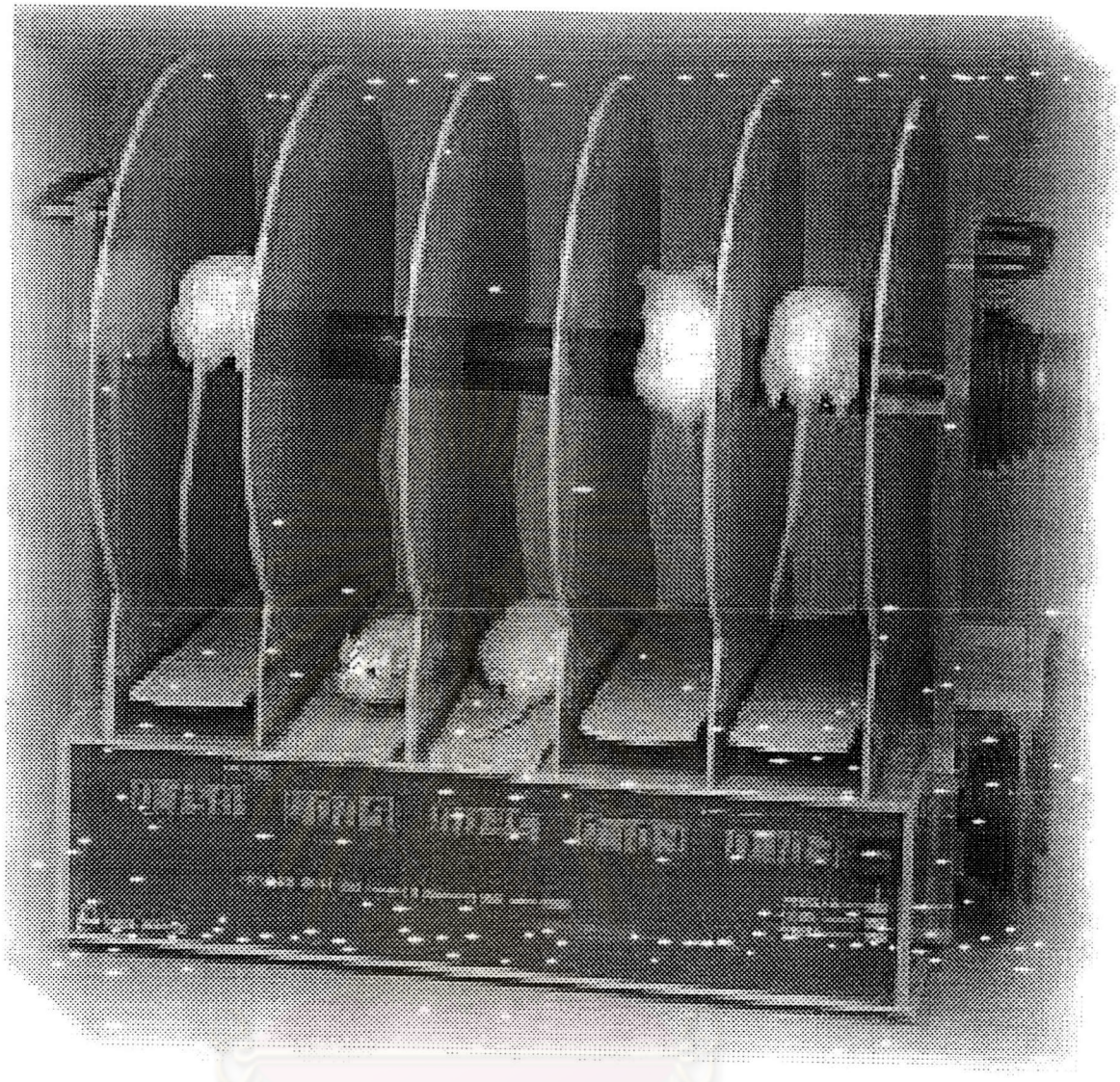
กลุ่มที่ 4 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ ขนาด 40 mg /kg/BW (i.p.)

กลุ่มที่ 5 ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ ขนาด 200 mg /kg/BW (i.p.)

3.) หลังได้รับสารทดสอบที่เวลา 30 นาที ,60 นาที , 120 นาที 180 นาที และ 300 นาที นำหนูมาเดินบน Rotating bar ซึ่งต่อกับคอมพิวเตอร์สำหรับแสดงเวลา ทำการบันทึกจำนวนที่หนูสามารถไต่บน Rotating bar ได้ใน 1นาที ถ้าหนูตกก่อนเวลา 1 นาที จะบันทึกเวลาที่หนูไต่ได้โดย set เวลาไว้ที่ 0 เวลาจะหยุดเมื่อหนูตกลงมาและกดคานทำให้วงจรปิด และ เวลาจะหยุดเดิน(โดยผลนี้ดูได้จากจอ monitor ที่เชื่อมกับ Rotating bar) ถ้าหนูสามารถเดินทรงตัวบน Rotating bar ได้อย่างน้อย 1 นาที ในการไต่ทั้งหมด 3 ครั้ง จะถือว่าหนูมี motor co-ordination ปกติ หลังจากนั้นบันทึกจำนวนและเวลาของหนูที่มีmotor co-ordination ปกติ และ ผิดปกติไว้

4.) นำผลการทดลองของหนูในแต่ละกลุ่มที่มี motor co-ordination ปกติมาเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มเดียวกัน และ คิดเป็น % ของหนูที่มี motor co-ordination ปกติ แล้วนำผลของแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 8 แสดงการเดินบน Rotarod bar ของหนูถีบจักร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular system)

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อหัวใจห้องบนข้างขวาที่แยกออกจากกายหนูขาว (isolated right auricle) (n=8) (Rosario Jimenez,2002)

วิธีการทดลอง

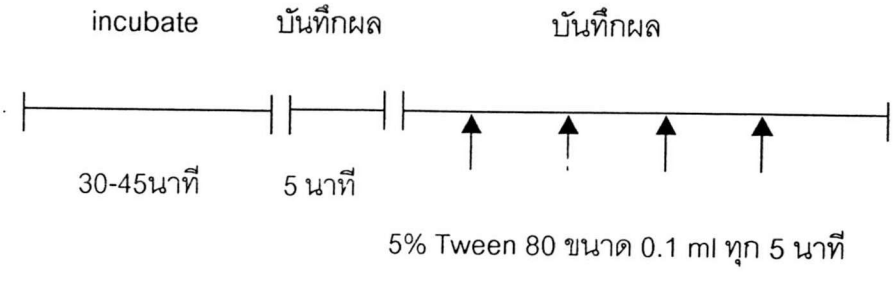
การเตรียมหัวใจห้องบนขวา

1.) ทำให้หนูขาวสลบด้วยการตีระหว่างคอ และ หัว

2.) เปิดช่องอกโดยใช้กรรไกรและปากคีบ เปิดกล้ามเนื้อตั้งแต่ใต้กระดูกหน้าอกออกทางด้านข้างจะเห็นหัวใจเต้นอยู่ในเยื่อหุ้มหัวใจ (pericardium) ทำการผ่าตัดเอาเยื่อหุ้มหัวใจออกให้หมดแล้วใช้กรรไกรเล็กตัดแยกหัวใจออกจากตัว มาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย KHS และก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลาตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างด้วยสารละลาย KHS แยก auricle ข้างขวาที่มีการเต้นเป็นจังหวะ (automaticity) ออกมา ใช้ทั้งชิ้นไม่มีการแบ่งหนู 1ตัวได้ 1 ชิ้น ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้าง ผูกปลายด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 $\pm$ 0.5 ^{o}C และบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 ml โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกการเต้นของ right auricle จนเต้นสม่ำเสมอ incubate หัวใจห้องบนขวานานประมาณ 30-45นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที

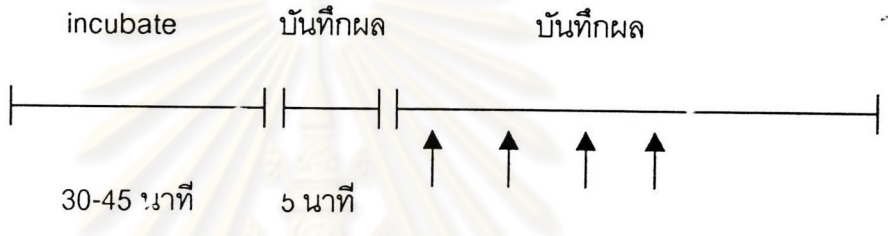
3.1.1.ศึกษาผลของตัวทำละลายสาร 5%Tween80 ต่อหัวใจห้องบนขวาที่แยกออกจากกายหนูขาว (isolated right auricle)

ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% Tween 80 ที่ให้แบบสะสม เมื่อ incubate หัวใจห้องบนขวาจนมีอัตราการเต้นและการบีบตัวคงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีหัวใจห้องบนขวา ทุก 5 นาที จำนวน 4 ครั้ง นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



3.1.2 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์ที่ละลายใน 5% Tween 80ในขนาด 4 μg, 20 μg, 100 μg, 500 μg/ml ต่อการบีบตัวของหัวใจห้องบนข้างขวาที่แยกออกจากกายหนูขาว (Isolated right auricle) (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 เมื่อ incubate หัวใจห้องบนขวาจนมีอัตราการเต้นและการบีบตัวคงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 4 μg, 20 μg, 100μg, 500 μg/ml ลงใน organ bath ที่มีหัวใจห้องบนข้างขวาทุก 5 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



การทดลองที่ 3.2 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจากกายหนูขาว (isolated aorta) (n=8) (Rosario Jimenez,2002)

วิธีการทดลอง

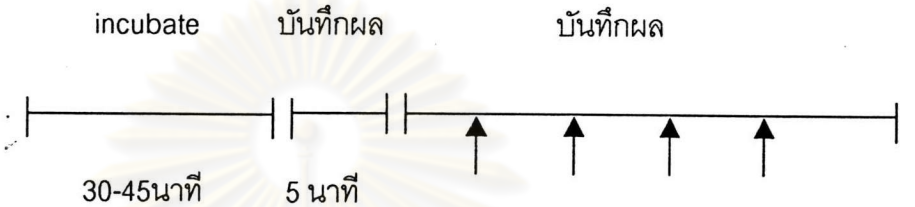
การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta)

-ทำให้สลบด้วยการดีระหว่างคอและหัว

-ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายเอาหัวใจและปอดออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่กับกระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ในช่องอกตัดเอามาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย KHS และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ค่อยๆเลาะเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างเลือดที่อยู่ภายในหลอดเลือดออกให้หมดด้วยสารละลาย 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

3.2.1.ศึกษาผลของตัวทำละลายสาร 5%Tween80 ต่อหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจากกายหนูขาว (isolated aorta) (n=8)

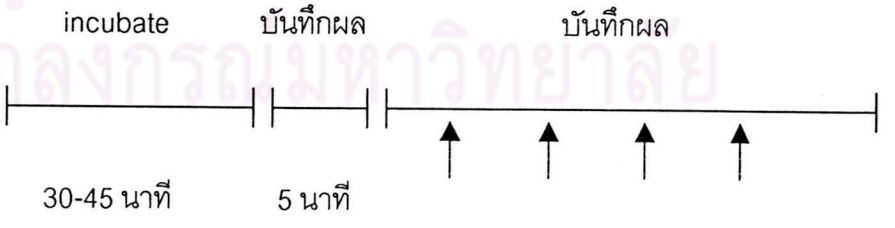
ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% Tween 80 ที่ให้แบบสะสม เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแดง ทุก 5 นาที จำนวน 4 ครั้ง นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



5% Tween 80 ขนาด 0.1 ml ทุก 5 นาที

3.2.2 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% tween 80 ในขนาด 4 μg, 20 μg, 100 μg, 500 μg/ml ใน organ bath ต่อการบีบตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ ของหนูขาว (n=8)

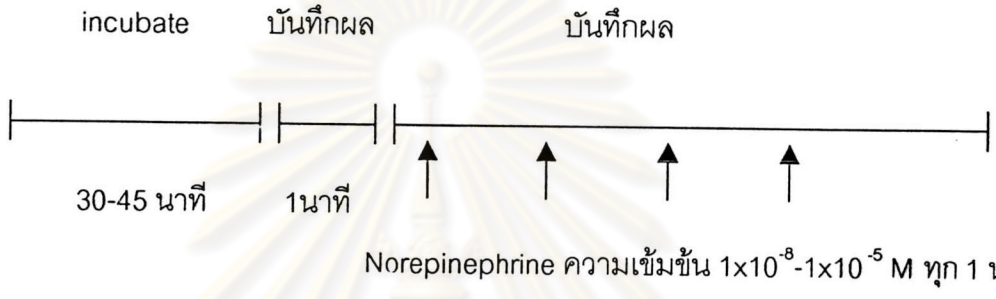
ศึกษา cumulative dose-response curve ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 4 μg, 20 μg, 100 μg, 500 μg/ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแดงใหญ่ ทุก 5 นาทีบันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5%Tween 80 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ4 μg - 500μg/ml
ทุก 5 นาที

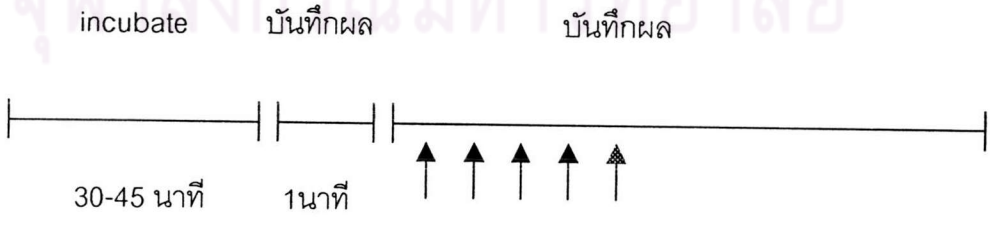
3.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว ที่ถูกกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของ Norpeinephine เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Norpeinephine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01ml ลงใน organ bath ทุก 1 นาที นำผลมาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



3.2.4 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ ของหนูขาว ที่ถูกกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ก่อนให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 100 μg/ml (n=8)

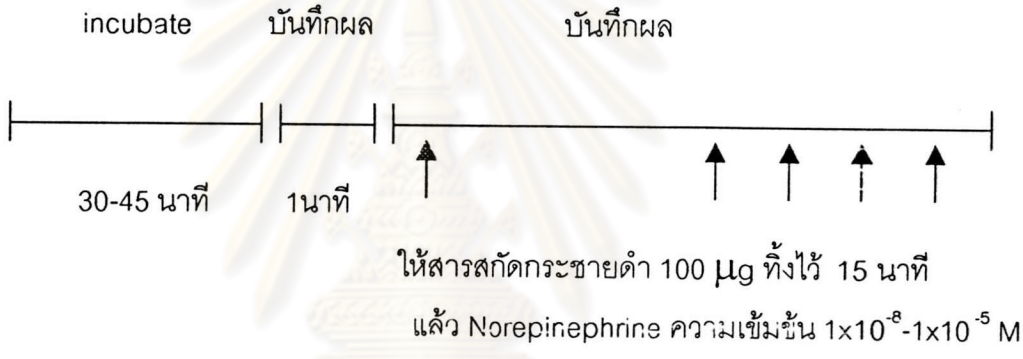
ศึกษา cumulative dose-response curve ของหลอดเลือดแดงใหญ่ต่อ Norepinephrine ร่วมกับได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01 ml ลงใน organ bath ที่มี หลอดเลือดแดงใหญ่ ทุก 1 นาที หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 100μg/ml ทิ้งไว้ 15 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ 1 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



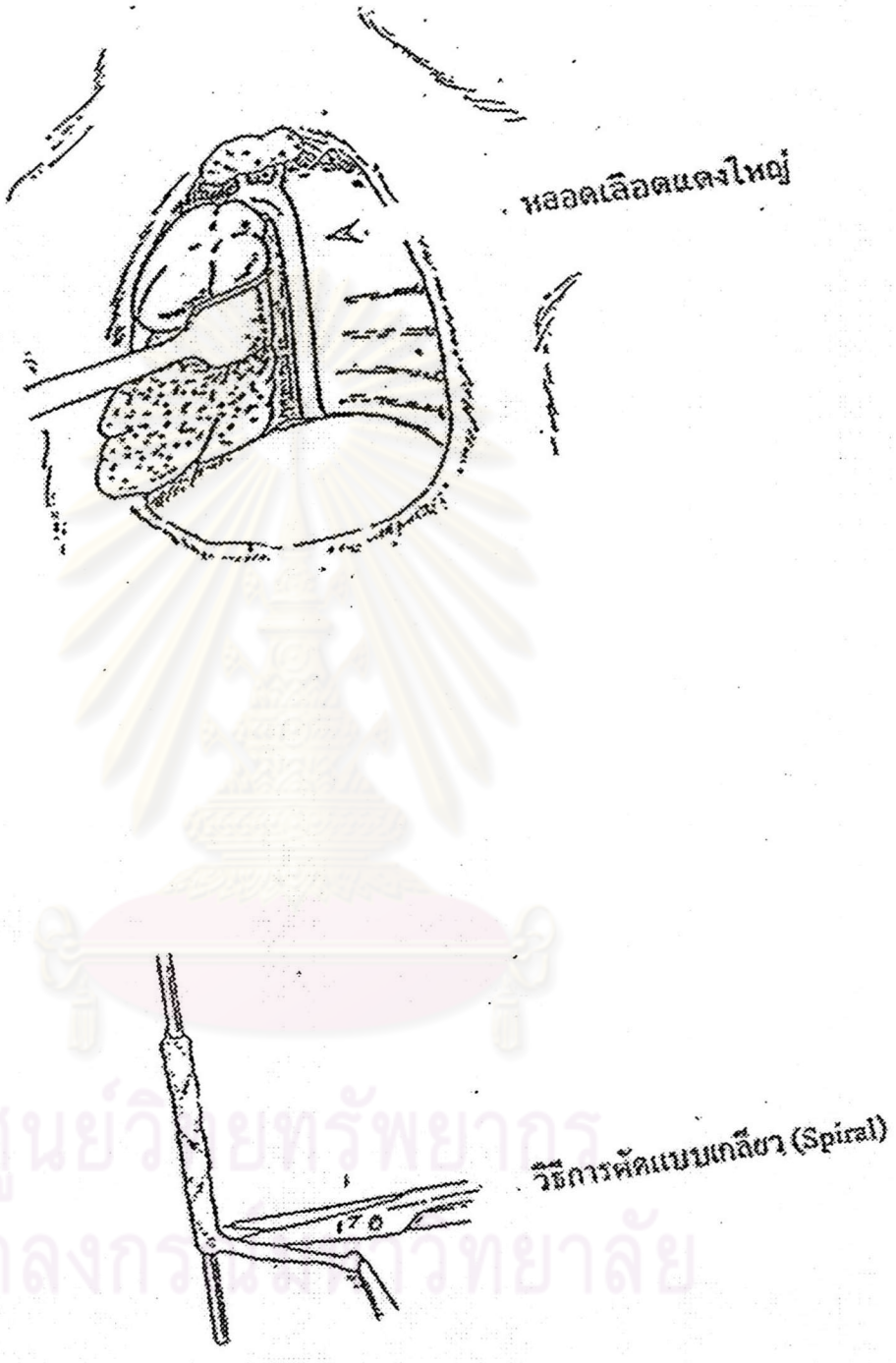
Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ทุก 1 นาที
แล้วให้สารสกัดกระชายดำ 100 μg ทิ้งไว้ 15 นาที

3.2.5 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ ของหนูขาว ที่ถูกกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M หลังให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 100 μg/ml (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำร่วมกับ Norepinephrine เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีการทำงานที่คงที่แล้ว โดยบันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 100μg/ml จำนวน 0.1 ml ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแดงใหญ่ ทุก 1 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ 1 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่ (Thoracic aorta) และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว (W.L.M. Perry,1968)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ระบบหายใจ (Respiratory system)

การทดลองที่ 4.1 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อหลอดลมของหนูตะเภาที่แยกออกจากกายหนู (isolated trachea) (n=8) (Wum-Chang Ko ,2002)

วิธีการทดลอง

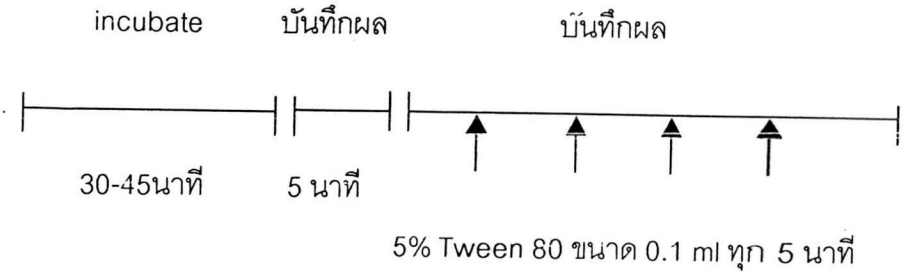
1.) ทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว

2.)ผ่าตัดเปิดช่องคอจนถึงช่องอก แยกตัดเอาหลอดลมออกมา โดยตัดให้ต่ำกว่ากล่องเสียงประมาณ 5 มิลลิเมตร และตัดให้มีความยาวของหลอดลมประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร นำหลอดลมที่แยกออกมาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย KHS และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ค่อยๆ เลาะเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด แล้วแบ่งหลอดลมออกเป็น 2 ท่อน ท่อนยาวประมาณ 1 ซม.ใช้ทดลองได้ 2 ครั้ง ตัดหลอดลมเป็นแบบซิกแซก (Blattner et al ;1980) แล้วใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน ด้านหนึ่งผูกกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่

37 $\pm$ 0.5 °C และบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 ml โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง แล้ว incubate หลอดลมนานประมาณ 45-60 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที

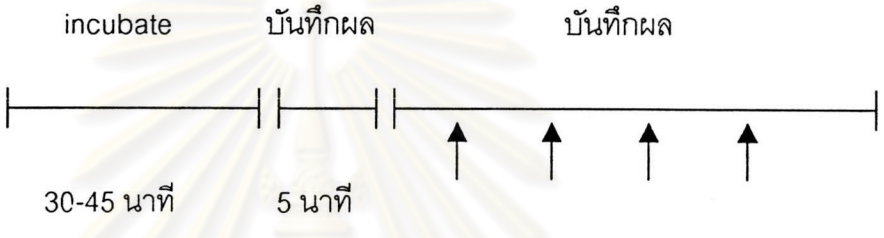
4.1.1.ศึกษาผลของตัวทำละลายสาร 5%Tween80 ต่อหลอดลมที่แยกออกจากหนูตะเภา (isolated trachea) (n=8)

ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% Tween 80 ที่ให้แบบสะสม เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดลมมีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาที เป็น control หลังจากนั้นให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดลม ทุก 5 นาที จำนวน 4 ครั้ง บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 5% Tween 80 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



4.1.2 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% tween 80 ในขนาด 4 μg, 20 μg, 100 μg, 500 μg/ml ใน organ bath ต่อการบีบตัวของหลอดลมของหนูตะเภา (n=8)

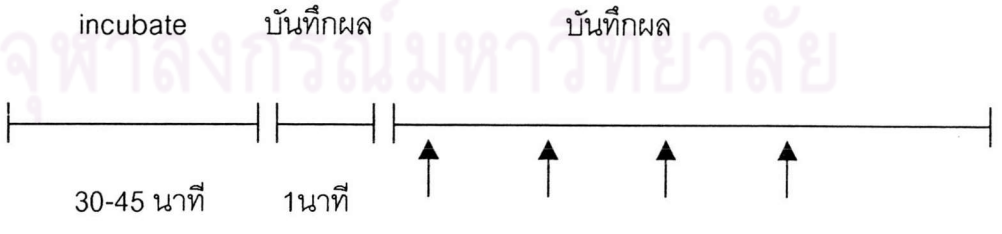
ศึกษา cumulative dose-response curve ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดลมมีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาที เป็น control หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 4 μg,20 μg,100 μg, 500 μg/ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดลม ทุก 5 นาที บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ4 μg - 500μg/ml
ทุก 5 นาที

4.1.3 ศึกษาผลการบีบตัวของหลอดลมของหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นด้วย Histamine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M (n=8)

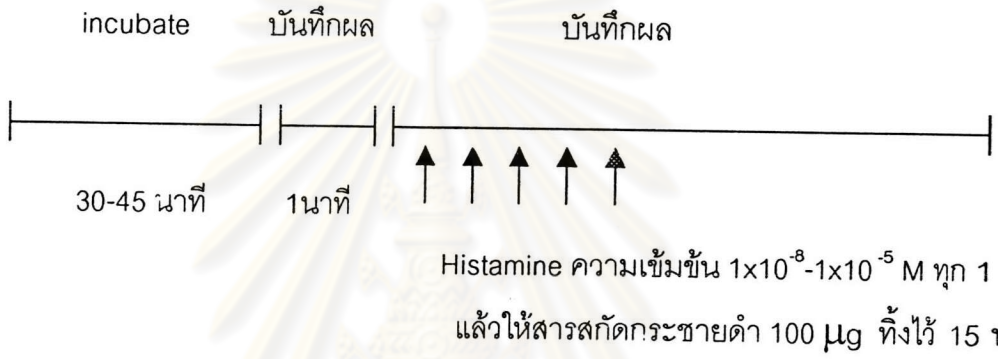
ศึกษา cumulative dose-response curve ของ Histamine สะสม เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดลมมีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Histamine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$- $1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดลมทุก 1 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



Histamine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ทุก 1 นาที

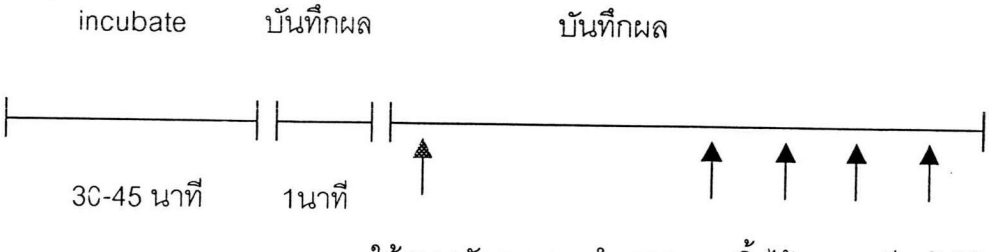
4.1.4 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของหลอดลมของหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นด้วย Histamine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ก่อนให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 100 μg/ml (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของหลอดลมต่อ Histamine ร่วมกับได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดลมมีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Histamine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดลม ทุก 1 นาที หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 100μg/ml ทิ้งไว้ 15 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ 1 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



4.1.5 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของหลอดลมของหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นด้วย Histamine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M หลังให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 100 μg/ml (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของหลอดลมที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำร่วมกับ Histamine เมื่อ incubate จนกระทั่งหลอดลมมีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control แล้วจึงให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 100μg/ml จำนวน 0.1 ml ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นด้วยHistamine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$M จำนวน 0.01 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดลมทุก 1 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ1 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



ภาพที่ 10 แสดงการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลม โดยการตัดแบบซิกแซก (zigzag)

(W.L.M. Perry,1968)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21939433

5. กล้ามเนื้อเรียบอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Corpus carvernosum smooth muscle)

การทดลองที่ 5.1 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อกล้ามเนื้อเรียบ corpus cavernosum ที่แยกออกจากกายหนูขาว(isolated corpus cavernosum) (n=8) (Ahmad Reza Dehpour ,2003 และ Thomas M Mills,2001)

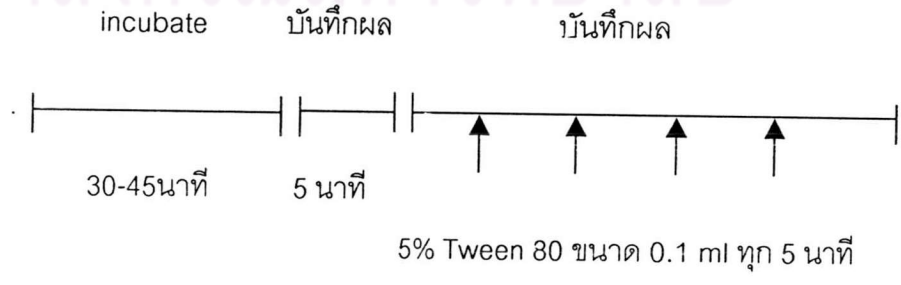
วิธีการทดลอง

1.) ทำให้สลบด้วยการตีระหว่างคอและหัว

2.) ตัดอวัยวะสืบพันธุ์ออกมา แล้วทำการตัด glans penis และ urethra ทิ้ง แยกเอา corpus cavernosum ออกมาประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย KHS และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ค่อยๆ เลาะเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด หลังจากนั้นทำการตัด fibrous septum ออก เพื่อแยกเนื้อเยื่อออกเป็น 2 ส่วน และตัดให้แต่ละส่วนมีความยาว ~3-4 มิลลิเมตร แล้วใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน ด้านหนึ่งผูกกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37± 0.5 °C และบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 ml โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง แล้ว incubate นานประมาณ 60 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที

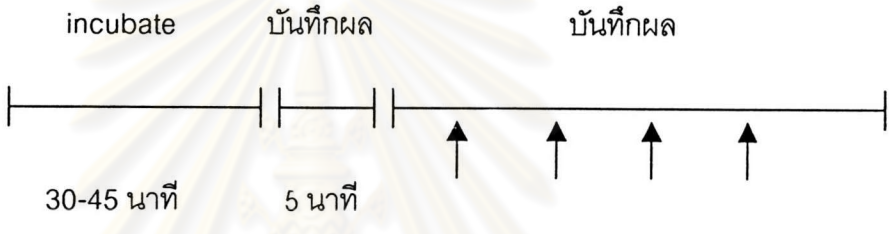
5.1.1.ศึกษาผลของตัวทำละลายสาร 5%Tween80 ต่อกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ที่แยกออกจากหนูขาว (isolated corpus carvernosum) (n=8)

ศึกษาผลของตัวทำละลาย 5% Tween 80 ที่ให้แบบสะสม เมื่อ incubate จนกระทั่งกล้ามเนื้อ corpus carvernosum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้ตัวทำละลาย 5% Tween 80 ในขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ทุก 5 นาที จำนวน 4 ครั้ง บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 5% Tween 80 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



5.1.2 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% tween 80 ในขนาด 4 μg, 20 μg, 100 μg, 500 μg/ml ใน organ bath ต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ของหนูขาว (n=8)

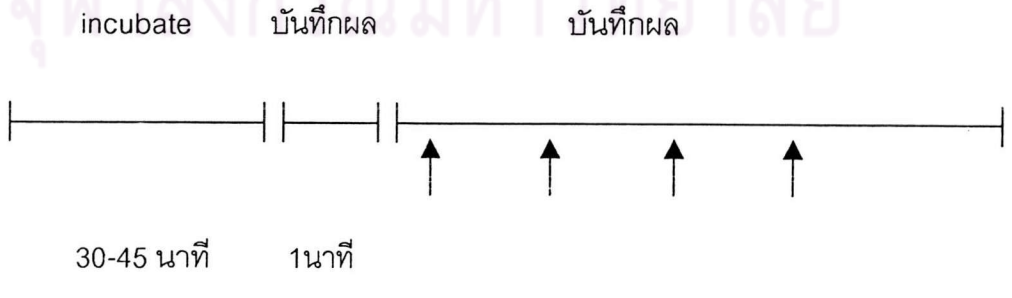
ศึกษา cumulative dose-response curve ของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 เมื่อ incubate จนกระทั่งกล้ามเนื้อ corpus carvernosum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 4 μg , 20 μg , 100 μg, 500μg/ml จำนวน 0.1 ml ลงใน organ bath ที่มีกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ทุก 5 นาที บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ละลายใน 5% Tween 80 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ4 μg - 500μg/ml
ทุก 5 นาที

5.1.3 ศึกษาผลต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ของหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M (n=8)

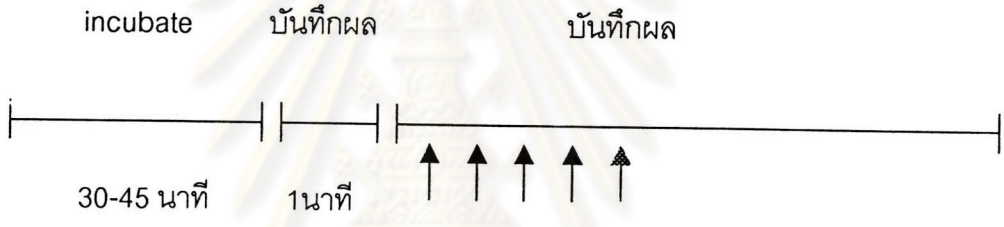
ศึกษา cumulative dose-response curve ของ Norepinephrine ต่อกล้ามเนื้อ corpus carvernosum เมื่อ incubate จนกระทั่งกล้ามเนื้อ corpus carvernosum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ทุก 1 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ 1 นาที นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ทุก 1 นาที

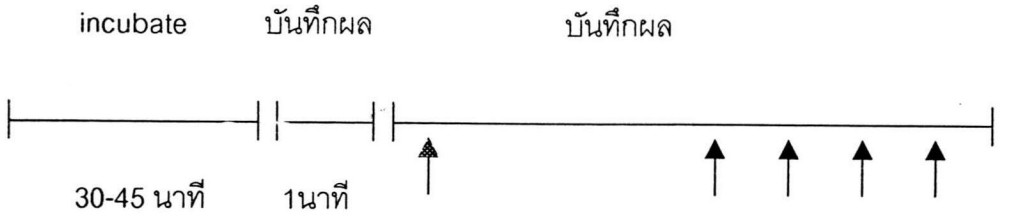
5.1.4 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ของหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ก่อนให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 100 μg/ml (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ต่อ Norepinephrine ร่วมกับได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำ เมื่อ incubate จนกระทั่งกล้ามเนื้อ corpus carvernosum มีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01 ml ลงใน organ bath ที่มีกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ทุก 1 นาที หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 100μg/ml ทิ้งไว้ 15 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ 1 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง

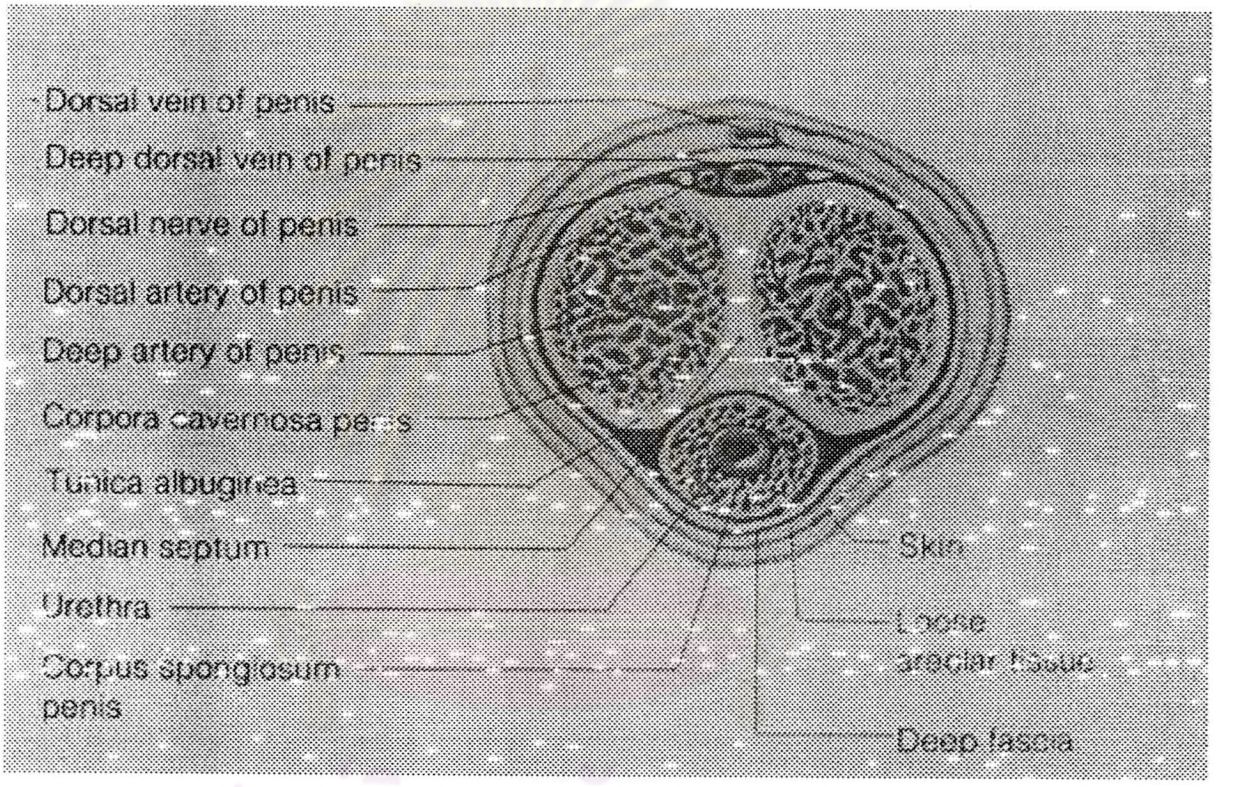


5.1.5 ศึกษาผลของสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ของหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M หลังให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำในขนาด 100 μg/ml (n=8)

ศึกษา cumulative dose-response curve ของกล้ามเนื้อ corpus carvernosum ที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำร่วมกับ Norepinephrine เมื่อ incubate จนกระทั่งกล้ามเนื้อ corpus carvernosum มีการทำงานที่คงที่ บันทึกผล 1 นาทีเป็น control หลังจากนั้นให้สารสกัดแอลกอฮอล์กระชายดำที่ความเข้มข้น 100 μg/ml จำนวน 0.1 ml ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย Norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M จำนวน 0.01 ml ลงใน organ bath ที่มี กล้ามเนื้อ corpus carvernosum ทุก 1 นาที บันทึกผลหลังได้รับสารทดสอบ 1 นาที นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



ให้สารสกัดกระชายดำ 100 μgทิ้งไว้ 15 นาที แล้วให้ Norepinephrine **ความเข้มข้น** $1x10^{-8}$-$1x10^{-5}$ M ทุก 1 นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 11 แสดงภาพ cross section ของ penis

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

ผลการทดลองรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean ± standard error of mean)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Analysis of Variance (ANOVA) หาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ Independent sample t – test (Student's unpaired t-test)

พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย