บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศเมียพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 100 – 150 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม จำนวน 60 ตัว ให้สัตว์ทดลองพักฟื้นก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ให้อาหารสำเร็จรูป CP082 mice feed และน้ำสะอาดไม่จำกัดปริมาณ

หมายเหตุ งานวิจัยนี้ใช้เนื้อเยื่อที่ได้รับมาจากอีกโครงการหนึ่ง ซึ่งได้รับใบอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองแล้ว จากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 สมุนไพรและแหล่งที่มา

การเตรียมสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก

สารสกัดเอธานอลจากว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.พ.ต.ท.หญิงสมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วนิดา (2547) นำมาสกัดโดยนำส่วนลำต้นใต้ดิน (เหง้า) ของว่านชักมดลูกมาแช่ในเอธานอล 95 % เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อแยกเอากากและตะกอนทิ้งไป จะได้สารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูกซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวหนืด สีน้ำตาลดำ มีกลิ่นฉุน นำมาใส่ขวดสีชา ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้ในการศึกษาทดลอง และได้วิเคราะห์หาสารโดยใช้วิธี HPLC พบว่าในว่านชักมดลูกที่สกัดด้วย 95% เอธานอล ได้สารสำคัญ คือ 1,7 diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

1.3 สารเคมี

- Sodium chloride — Sigma, USA.
- Methanol — Merck, Germany.
- Estradiol valerate (Progynon) — Schering, Germany.
- Zoletil® (Tiletamine + Zolacepam) — Virbac, Germany.
- Lanthanum chloride — Sigma, USA.
- Nitric acid — Sigma, USA.
- $ZnSO_4$ — Oxford, USA.
- Cd bead — Oxford, USA.
- Nitrite — Oxford, USA.
- HCl — Oxford, USA.
- NH_4OH — Oxford, USA.
- Griess reagent 1(sulfanilamide (p- aminobenzenesulfonamide) — Oxford, USA.
- Griess reagent 2(N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride) — Oxford, USA.

1.4 เครื่องมือ

- ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก
- เตาเผากระดูก (รุ่น Vulcan 3-1750, Furnace)
- เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (รุ่น SpecAA220, Shimutzu)
- เครื่องชั่งละเอียด (รุ่น A 200 S, Satorius)
- เครื่อง microplate reader (รุ่น Sunrise, Tecan)
- Autopipets ขนาด 20, 100, 200, 1000 ไมโครลิตร (Gibson, Germany)
- เครื่อง Microcentrifuge (รุ่น 210A, Denville)
- เครื่อง Vortex (VM-300, Gemmy industrial)
- EDTA tube

2. วิธีดำเนินการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> การผ่าตัดเอารังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง (Ovariectomy)

โดยหนูขาวทั้งหมดถูกเลือกโดยวิธีการสุ่ม แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว โดยกลุ่มที่1- 5 จะถูกทำการผ่าตัดเอารังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง โดยทำให้หนูหมดความรู้สึกโดยใช้ Zoletil® ขนาด 20 – 40 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว โกนขนและทำความสะอาดผิวหนังบริเวณท้องทั้ง 2 ข้าง เปิดผนังช่องท้องผ่านชั้นใต้ผิวหนังจนไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ ใช้ปากคีบ ๆ รังไข่ขึ้นมา ใช้ไหมละลายผูกรังไข่ จากนั้นตัดรังไข่ออก เย็บปิดผนังช่องท้องด้วยไหมละลาย เบอร์ 4/0 ทาแผลด้วย betadine จากนั้นทำวิธีเดียวกันกับรังไข่อีกข้าง

หมายเหตุ: การทดสอบระยะตกไข่ โดยวิธี vaginal smear

ทำหลังจากตัดรังไข่หนู 3 สัปดาห์ โดยใช้สำลีพันปลายไม้ขนาดเล็กชุบ 0.9% sodium chloride สอดเข้าไปในช่องคลอดของหนูขาว ค่อยๆหมุนตามเข็มนาฬิกา จากนั้นนำมาป้ายกับกระจก slide รอจนแห้ง จากนั้นนำ slide มาแช่ ใน methanol เป็นเวลา 1 นาที รอจน slide แห้งก่อนนำไปย้อมสี giemsa เป็นเวลา 30 นาที รอให้แห้งอีกครั้ง แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูว่าหนูมีการตกไข่หรือไม่ เมื่อหนูไม่มีการตกไข่ จึงนำไปทำการทดลองต่อไป

2.1 การศึกษาผลของสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูก โดยการป้อนสารสกัดว่านชักมดลูกให้กับสัตว์ทดลอง

หนูขาวทั้งหมดถูกเลือกโดยวิธีการสุ่ม แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว โดยกลุ่มที่1- 5 จะถูกทำการผ่าตัดเอารังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง แล้วนำมาเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ก่อนได้รับสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1: หนูขาวที่ได้ถูกตัดรังไข่ออก ได้รับน้ำมันข้าวโพด โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + oil)

กลุ่มที่ 2: หนูขาวที่ได้ถูกตัดรังไข่ออก ได้รับเอสตราไดออล วาเลอเรต (Progynon®) ขนาด 300 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + estrogen)

กลุ่มที่ 3: หนูขาวที่ถูกตัดรังไข่และได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูกขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการป้อนทางปากวันละครั้งทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + *C. comosa*)

กลุ่มที่ 4: หนูขาวที่ถูกตัดรังไข่และได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูกขนาด 250 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการป้อนทางปากวันละครั้งทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + *C . comosa*)

กลุ่มที่ 5: หนูขาวที่ถูกตัดรังไข่และได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูกขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการป้อนทางปากวันละครั้งทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + *C. comosa*)

กลุ่มที่ 6: หนูขาวที่ไม่ได้ถูกตัดรังไข่ออก ได้รับน้ำมันข้าวโพด โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (sham + oil)

หลังจากนั้นนำมาทดสอบในการทดลองต่อไป

2.2 การเตรียมกระดูกของหนูขาว

มีวิธีการเตรียมตามลำดับดังนี้ คือ ชั่งน้ำหนักตัวหนู เหนี่ยวนำให้หนูขาวสลบโดยฉีด Zoletil® (tiletamine + zolacepam) 50 มิลลิกรัม ขนาด 20-40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าช่องท้องของหนูขาว จากนั้นผ่าตัดเปิดช่องท้องยกอวัยวะภายในช่องท้องขึ้นให้หมด ตัดเส้นเลือด aorta จากนั้นเลาะกระดูกต้นขาขวา โดยใช้กรรไกรตัดเนื้อและเส้นเอ็นบริเวณนั้น แล้วค่อย ๆ หมุนและดึงกระดูกออกจากตัวหนูออกมา เลาะเนื้อที่ติดมากับกระดูกอีกครั้ง และใช้ผ้าก๊อซถูกระดูกเพื่อเอาชิ้นเนื้อออกจากกระดูกให้หมด เก็บกระดูกในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทเก็บในช่องแช่แข็ง ถ้ายังไม่ได้นำไปทำการทดลองทันที

<u>**การทดลองที่ 2**</u> การวิเคราะห์น้ำหนักของหนูขาวตั้งแต่เริ่มศึกษาจนสิ้นสุดการทดลอง

ชั่งน้ำหนักตัวหนูขาวทุกตัวและทุกกลุ่มการทดลองจดบันทึกไว้ ตั้งแต่วันแรกที่เลี้ยงสัตว์ทดลองจนกระทั่งสิ้นการทดลอง นำมาเปรียบเทียบเพื่อดูน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของหนูในแต่ละกลุ่ม

<u>**การทดลองที่ 3**</u> การตรวจวิเคราะห์น้ำหนักและปริมาณแคลเซียมในกระดูกของหนูขาว

นำกระดูกที่แช่แข็งไว้ออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดูกอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักกระดูกเปรียบเทียบ คำนวณ น.น. กระดูก/น.น ตัว จากนั้นนำมาเผาต่อที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักเถ้ากระดูก จากนั้นนำเถ้ากระดูกมาละลายใน 1% nitric acid ให้ได้ 10 ml และเติม

lanthanum chorlide ซึ่งเป็นตัวจับกับแคลเซียม ละลายให้ได้ความเข้มข้น 1 : 5,000 จากนั้นนำไปวัดปริมาณแคลเซียม โดยใช้วิธี Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ที่ความยาวคลื่น 477 nm ซึ่งAAS ใช้หลักการกระบวนการที่เกิดจากอะตอมเสรีของธาตุดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นอันหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของธาตุ ธาตุแต่ละชนิดจะมีระดับพลังงานแตกต่างกัน จึงมีการดูดกลืนพลังงานแตกต่างกัน เช่น อะตอมของแคลเซียมจะดูดกลืนได้ดีที่ความยาวคลื่น 477 nm เพราะแสงที่ความยาวคลื่นนี้เป็นแสงที่มีพลังงานพอดีที่จะทำให้อิเล็กตรอนของแคลเซียม อะตอมเกิดการเปลี่ยนสถานะจากสถานะพื้นไปสู่สถานะกระตุ้น ซึ่งความยาวคลื่นนี้จัดเป็น spectroscopic line ของอะตอมมิกสเปกตรัม ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของธาตุแต่ละชนิด ในการทำให้อะตอมของธาตุในสารประกอบเกิดเป็นอะตอมเสรีได้นั้น ต้องมีการดูดกลืนพลังงานเข้าไปซึ่งอาจอยู่ในรูปต่าง ๆ กัน เช่น พลังงานความร้อนจากเปลวไฟ ความร้อนจะทำให้เกิดกระบวนการแตกตัว (dissociation) หรือเปลี่ยนให้เป็นไอ (vapolization) หรืออาจแตกตัวเป็นอะตอมหรือทำให้อะตอมอยู่ในสถานะกระตุ้น หรืออาจกลายเป็นไอออนได้

<u>การทดลองที่ 4</u> การศึกษาจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

เลาะกระดูกต้นขาซ้าย ออกจากตัวหนู แช่ในสารละลาย 10% buffer formalin นาน 1 สัปดาห์ จากนั้นแช่ในน้ำยาสลายกระดูก (decalcification) โดยต้องเปลี่ยนน้ำยาทุก ๆ 3 วันจนกว่ากระดูกจะนิ่ม ล้างด้วยน้ำสะอาดไหลผ่านประมาณ 30 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลาย 10% buffer formalin ต่อตัดเป็นชิ้นๆตามยาว จากนั้นเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อดูจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อกระดูก ย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin (H&E) ตามวิธีของ ศุภลักษณ์ (2537) จากนั้นส่องกล้องดูโครงสร้างกระดูกด้วยกล้องจุลทรรศน์

การแบ่งเกรดของโรคกระดูกพรุน

0	=	ไม่พบรอยโรค
+1. Mild	=	มีการเสื่อมสภาพและเกิดเนื้อตายของกระดูกเกิดขึ้นเล็กน้อยเพียง 2-3 จุด
+2. Moderate	=	มีการกระจายของ osteocytes มีการเสื่อมสภาพและเกิดเนื้อตายมากกว่า 3 จุด
+3. Severe	=	มีการเสื่อมสภาพและเนื้อตายเกิดขึ้นทั่วกระดูก (Shaft bone) กระดูกมีรูพรุน (porous) มีจำนวน osteocytes เล็กน้อย กระดูกมีขนาดบาง พบ fat cell แทนที่ bone marrow

<u>การทดลองที่ 5</u> การตรวจค่าทางชีวเคมี

5.1 เก็บเลือดหนูขาวโดยการเจาะจากหัวใจโดยตรง ตรวจค่าทางชีวเคมี(blood chemistry) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ alkaline phosphatase โดยใช้ชุดทดสอบของหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 ตรวจปริมาณระดับ Nitrite production ในเลือดซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ของ Nitric Oxide โดยใช้ชุดทดสอบของบริษัท Oxford ซึ่งเป็น non – enzymatic assay และพัฒนาขึ้นตามวิธีของ Schmidt (1995) ดังนี้ ล้าง Cd bead ออก 2 ครั้งด้วย H_2O , 0.1M HCl และ 0.1M NH_4OH นำตัวอย่างเลือด 50 µl มาเติมน้ำกลั่นให้ได้ 190 µl และเติม 30 % $ZnSO_4$ ลงไป 10 µl เพื่อให้เกิดการตกตะกอนโปรตีน ผสมโดยใช้เครื่อง vortex และ incubate ต่อที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นแยก (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 – 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (supernatant) มาเติม Cd bead 0.5 g เพื่อทำการเปลี่ยน nitrate ให้เป็น nitrite incubate ต่อที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นแยกอีกครั้ง เก็บส่วนที่เป็นของเหลวข้างบนมาตรวจวิเคราะห์ โดยทำการเติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 µl เติม color reagent 1(sulfanilamide) ละลายใน 3NHCl ปริมาณ 50 µl และเติม color reagent2(N-(1-naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride) (NNED) ละลายในน้ำปราศจากอิออน ปริมาณ 50 µl และวัดการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณ nitrite จาก standard curve

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistic data analysis)

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of means) วิเคราะห์ข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc range test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี least significant difference test (LSD) พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)