บทที่ 2

อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง, สมุนไพร, เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ

สัตว์ทดลอง : หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ (Wistar Strain rat) เพศผู้น้ำหนักประมาณ 90-100 กรัม จากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบล ศาลายา จ. นครปฐม หนูที่สั่งมาใหม่จะเลี้ยงไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาทำการวิจัย เพื่อให้หนูมีการปรับตัวและคุ้นเคยกับสถานที่เลี้ยงใหม่

สมุนไพร และแหล่งที่มา : ผงใบฟ้าทะลายโจร อบแห้ง บดละเอียดผ่านแร่ง No. 80 , สารสกัดอย่างหยาบด้วยแอลกอฮอล์ และสารสกัดอย่างหยาบด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์ และแหล่งที่มา

1. Indomethacin (Sigma Chemical Company)
2. Ibuprofen (Sigma Chemical Company)
3. Prednisolone (Sigma Chemical Company)
4. Methyl cellulose; 1,500 CPS (Sigma Chemical Company)
5. Carrageenan, Type IV, Lambda carrageenan (Sigma Chemical Company)
6. Heparin; 1,000 I.U./ml (Novo ind.)
7. Sodium chloride (E. Merck)
8. Alcohol 95 % (องค์การเภสัชกรรม)
9. Tincture Iodine (องค์การเภสัชกรรม)
10. Diethyl ether (May and Baker LTD.)
11. Wetting compound (imbibente$^{(R)}$) (Ugo basile)

วัสดุ และแหล่งที่มา

1. Flask ขนาด 25 ซีซี (Kimble)

2. สำลีปลอดเชื้อ โดยรังสีแกมมา (บริษัทเคนดอลล์-แกมมาตรอน จำกัด)

เครื่องมือ และแหล่งที่มา

1. Plethysmometer, Cat. 7150 (UGO BASILE) เป็นเครื่องมือสำหรับวัดปริมาตรการบวม โดยวัดที่บริเวณเท้าของหนูขาว หลักการทำงานของเครื่องใช้หลักการแทนที่น้ำโดยจะมีหลอดแก้วรูปทรงกระบอก ขนาดสูง 6 ซม. จำนวน 2 หลอด มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 และ 2 ซม. ทั้งสองหลอด มีช่องเล็ก ๆ เป็นทางเชื่อมติดต่อกันได้เมื่อใส่สารละลายลงไปในการวัดปริมาตรที่เปลี่ยนแปลงจะวัดด้วย Volume transducer ค่าที่อ่านได้เป็นตัวเลขมีหน่วยเป็นมิลลิลิตร (ดังรูปที่ 4)

2. Biological Microscope No. 155020 (Nikon Optiphot, Japan)

3. Hemacytometer or " Bright-Line " Counting Chamber, Improved Neubauer Ruling (AO scientific)

4. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (บริษัท วิศวิทย์)

5. เครื่องมือ ผ่าตัดและเย็บแผล พร้อมด้ายและเข็มเย็บ (วิทยาศรม)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

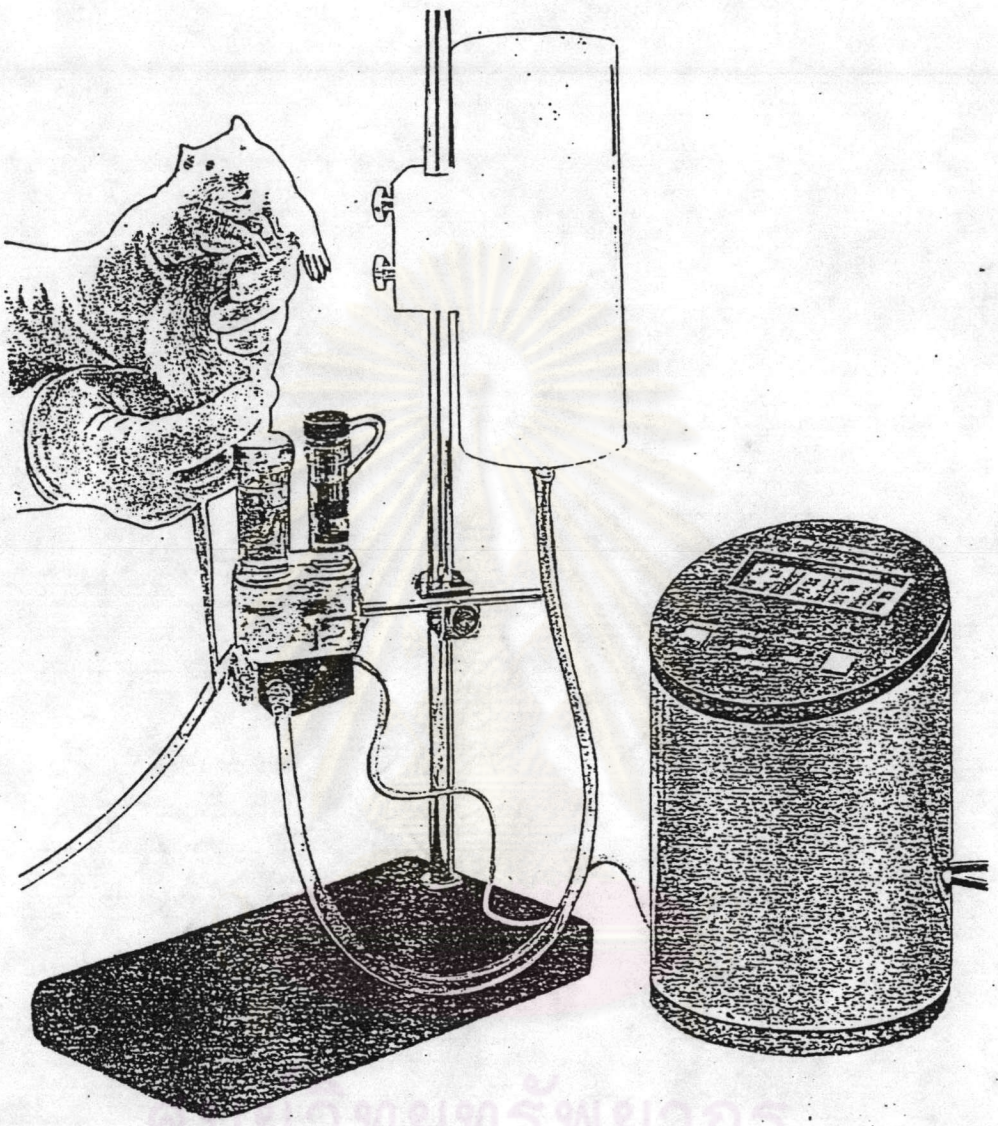
2.1 การเตรียมยาและสารชนิดต่าง ๆ

ก. การเตรียม 1 % methyl cellulose

เตรียมสารปริมาตร 500 ซีซี โดยชั่งผง methyl cellulose 5 กรัม โปรยสารทีละน้อยลงในน้ำอุ่น ใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ จนผง methyl cellulose พองตัวเต็มที่เก็บใส่ขวดปิดฝาติดฉลาก เป็น Stock solution สำหรับเตรียมยาแขวนตะกอนต่อไป

ข. การเตรียมยาแขวนตะกอนของ Prednisolone

ชั่ง Prednisolone จำนวน 10 มก. นำไปบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี และปรับปริมาตรให้ครบ 20 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.5 มก./มล. หรือ 5 มก./ น้ำหนักตัว 1 กก.



รูปที่ 4 ภาพแสดง Plethysmometer และวิธีการวัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. การเตรียมยาแขวนตะกอนของ Indomethacin

ชั่ง Indomethacin จำนวน 5 มก. และ 10 มก. นำไปบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี ปรับให้ได้ปริมาตร 20 มล. จะได้ยาที่แขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 มก./มล. และ 0.5 มก./มล. หรือ 2.5 และ 5 มก/ น้ำหนักตัว 1 กก. ตามลำดับ

ง. การเตรียมยาแขวนตะกอนของ Ibuprofen

ชั่ง Ibuprofen จำนวน 20 มก. นำไปบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose บดจนยาเข้ากันดี ปรับให้ได้ปริมาตรครบ 20 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 1 มก./มล. หรือ 10 มก./ น้ำหนักตัว 1 กก.

จ. การเตรียมยาแขวนตะกอนจากผงใบฟ้าทะลายโจร

ชั่งผงใบฟ้าทะลายโจร จำนวน 200,400, และ 1,000 มก. ตามลำดับ นำมาบดทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose จนยากระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกันปรับปริมาตรจนครบ 20 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 10,20, และ 50 มก./มล. หรือเท่ากับ 100, 200, และ 500 มก./น้ำหนักตัว 1 กก. ตามลำดับ

ฉ. การเตรียมยาแขวนตะกอนจากสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร

ชั่งสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร จำนวน 40, 80,200,400, และ 1,000 ตามลำดับ นำมาบดทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose จนยากระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกันปรับปริมาตรจนครบ 20 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 2,4,10,20, และ 50 มก./มล. หรือเท่ากับ 20,40,100,200, และ 500 มก./น้ำหนักตัว 1 กก. ตามลำดับ

ช. การเตรียมยาแขวนตะกอนจากสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร

ชั่งสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร 200, 400, และ 1,000 มก. ตามลำดับ นำมาบดทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose จนยากระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรจนครบ 20 มล. จะได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 10,20, และ 50 มก./ มล. หรือเท่ากับ 100, 200, และ 500 มก./น้ำหนักตัว 1 กก. ตามลำดับ

ช. การเตรียม 1 % Carrageenan in 0.9 % Sodium chloride solution

ชั่ง Carrageenan 0.1 กรัมแล้วนำมาใส่ในสารละลาย 0.9% Sodium chloride จำนวน 10 มล. ใส่ขวดปิดฝาให้มิดชิด ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 1-2 วัน เพื่อให้ Carrageenan พองตัวเต็มที่

ฌ. การเตรียม 10 mg % Heparinized saline

จากผง Heparin U.S.P. 120 Unit เท่ากับ 1 มก., Heparin (Novo) 1,000 IU. ต่อ มล. เท่ากับ 8.33 มก./มล. ใช้ Heparin 3 มล. ผสมลงใน normal saline solution 247 มล. จะได้สารละลาย 10 mg % Heparinized saline จำนวน 250 มล. เก็บไว้ในตู้เย็น

ญ. การเตรียมสารละลาย Wetting compound

ใช้ wetting compound 4-5 มล. และ Sodium chloride 0.4-0.5 กรัม ผสมรวมกันในน้ำกลั่น จำนวน 1 ลิตร ใส่ขวดปิดฝาให้มิดชิดเก็บเป็น Stock solution ใช้สำหรับวัดปริมาตรอุ้งเท้าของหนูขาว

2.2 <u>วิธีดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ</u>

ขั้นตอนที่ 1 : ศึกษาผลของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ต่อการยับยั้งอาการบวมจากการฉีดสารกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ

<u>การทำให้อุ้งเท้าหนูขาวเกิดอาการบวมด้วยสาร Carrageenan (Carrageenan foot edema test)</u>

เป็นการศึกษาการอักเสบ ชนิดเฉียบพลัน (acute inflammation) โดยการฉีดสาร Carrageenan เข้าที่อุ้งเท้าของหนูขาว เพื่อเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าของหนูขาว เกิดอาการบวม ตามวิธีการ ของ Winter, Risley, and Nuss (1962) มีขั้นตอนในการทดลองดังนี้ คือ

1. เตรียมหนูที่จะนำการทดลอง โดยอดอาหารหนู ให้แต่น้ำได้ เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารไปรบกวน bioavailability ของยา

2. ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัว เพื่อใช้คำนวณขนาดยาที่จะให้

3. ขีดเส้นรอบข้อเท้าหนูบริเวณ กระดูก lateral malleolus เป็นแนวที่จะใช้วัดปริมาตรของอุ้งเท้า

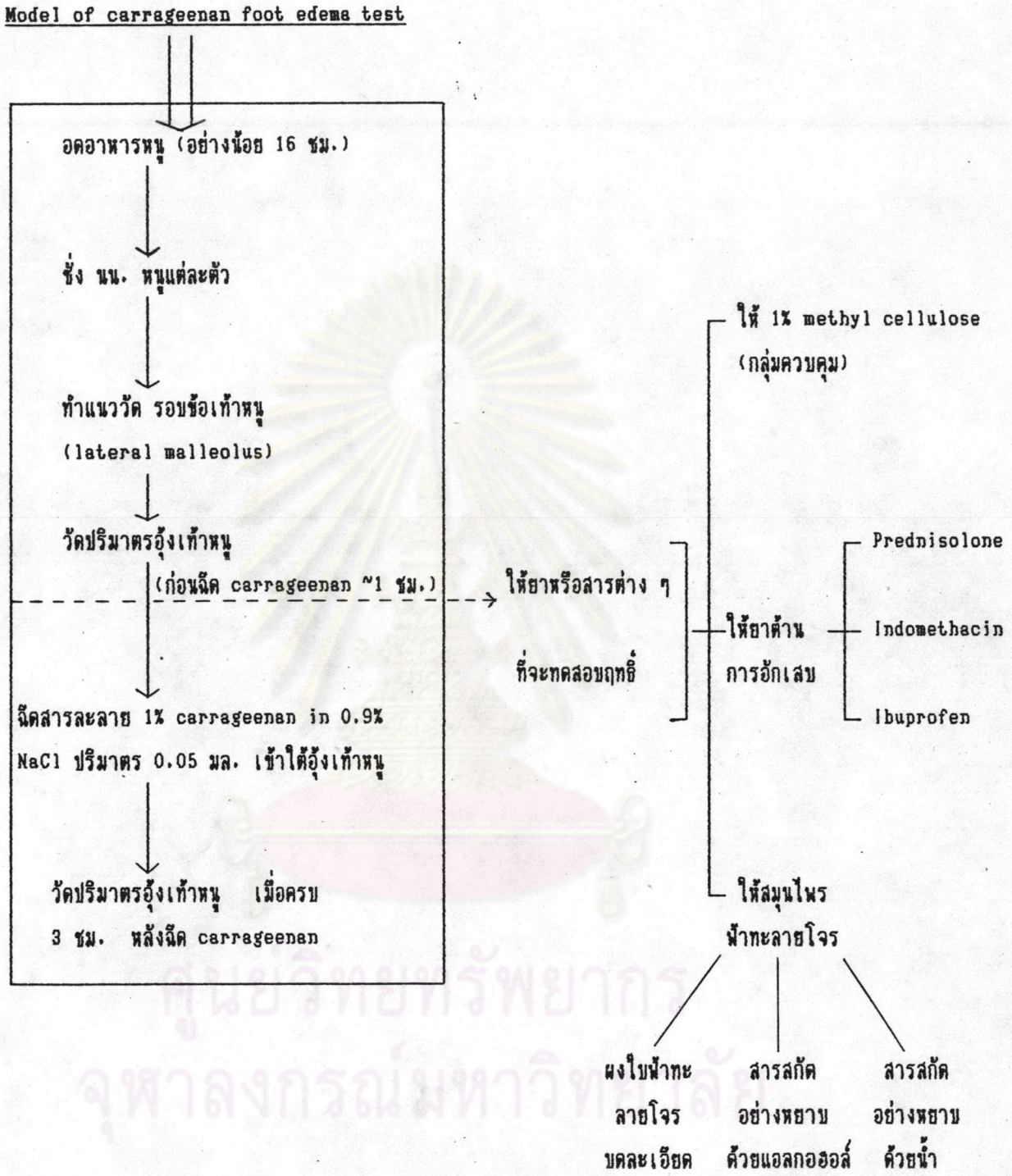
4. วัดปริมาตรอุ้งเท้าของหนู ก่อนทำการฉีดสาร carrageenan ด้วยเครื่อง Plethysmometer

5. ฉีดสารละลาย 1% carrageenan in 0.9 % sodium chloride ปริมาตรที่ฉีด 0.05 มล. เข้าที่บริเวณใต้อุ้งเท้าหนู (Subplantar injection) ชั้นใต้ผิวหนัง (Subcutaneous)

6. วัดปริมาตรอุ้งเท้าหนู อีกครั้ง เมื่อครบ 3 ชั่วโมง หลังจากฉีด carrageenan ทำให้อุ้งเท้าหนู เกิดอาการบวมแล้ว

7. ในกรณีที่จะทำการทดสอบ ยา หรือสารอื่น ๆ ว่ามีผลต่ออาการบวมหรือไม่นั้นจะทำการให้สาร หรือ ยานั้น ๆ ก่อนฉีด carrageenan เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง โดยให้ยาทางปาก ปริมาตรไม่เกิน 10 มล/นน. ตัว 1 กก. และระหว่างทำการทดลอง สามารถให้น้ำได้ ไม่เกินตัวละ 3 มล. ทั้งนี้เพื่อลดผลกระทบต่ออาการบวมที่เกิดขึ้น ให้น้อยที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แผนภูมิ แสดงขั้นตอนการทำให้อุ้งเท้าของหนูขาวเกิดอาการบวม (Carrageenan foot edema test) และวิธีการทดสอบฤทธิ์ ของยาต้านการอักเสบ, ผงใบฟ้าทะลายโจร, สารสกัดอย่างหยาบด้วยแอลกอฮอล์ และสารสกัดอย่างหยาบด้วยน้ำ จากใบฟ้าทะลายโจร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการศึกษาทำตามแผนภูมิรูปที่ 5 โดย แบ่งหนู เป็น 4 กลุ่ม โดยให้ยาเข้าทางปากโดยใช้ feeding syringe ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Prednisolone ขนาด 5 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Indomethacin ขนาด 5 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Ibuprofen ขนาด 10 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน ของ 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 2

ได้รับยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 100 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 3

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 20 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 40 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 100 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 4

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 100 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอาการบวม

ก่อนการกระตุ้นให้อุ้งเท้าหนูเกิดการอักเสบ จะวัดปริมาตรอุ้งเท้าข้างที่จะฉีดสาร carrageenan ก่อน โดยการทำเครื่องหมายที่บริเวณ กระดูก lateral malleolus ด้วยการขีดเป็นแนวเส้นที่ข้อเท้าข้างที่จะวัด (ข้างขวา) ของหนูทุกตัว ปริมาตรที่วัดได้ตอนนี้ จะเป็นปริมาตรของอุ้งเท้าหนูก่อนฉีด carrageenan (Vp) เมื่อให้ยาแต่ละชนิดทางปากครบ 1 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดสารกระตุ้นให้อุ้งเท้าหนูเกิดการอักเสบด้วย 1 % carrageenan in 0.9 % NaCl Solution , ปริมาตรที่ฉีด 0.05 มล. ที่ชั้นใต้ผิวหนัง (Subcutaneous) บริเวณใต้อุ้งเท้าหนูข้างขวา ตามวิธีการของ Winter, et al. (1962) ซึ่งพบว่าสาร carrageenan ทำให้อุ้งเท้าบวมมากที่สุดเห็นได้อย่างชัดเจน ในเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ภายหลังฉีดสาร carrageenan แล้ว ดังนั้นเมื่อกระตุ้นให้อุ้งเท้าของหนูเกิดการบวมครบ 3 ชั่วโมง จะทำการวัดปริมาตรของอุ้งเท้าหนูทุกตัวทั้งในกลุ่มที่ให้ยา และกลุ่มควบคุม โดยให้ปริมาตรของอุ้งเท้าหนูที่วัดได้ในกลุ่มได้รับยา (ยาต้านการอักเสบ หรือยาเตรียมจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร) เท่ากับ Vd; ส่วนปริมาตรของอุ้งเท้าหนูที่วัดได้ในกลุ่มควบคุม (ได้รับ 1 % methyl cellulose) เท่ากับ Vc; ปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าหนู (Volume of edema) จะเท่ากับ ปริมาตรอุ้งเท้าโดยวัดที่ 3 ชั่วโมง หลังฉีด carrageenan ลบด้วยปริมาตรอุ้งเท้าก่อนฉีด carrageenan ดังนั้น ปริมาตรการบวมในกลุ่มควบคุม = Vc-Vp และ ปริมาตรการบวมในกลุ่มที่ได้รับยา = Vd-Vp

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอาการบวม ได้จาก

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(Vc-Vp)-(Vd-Vp)}{(Vc-Vp)}$$

$$= \left(1 - \frac{Vd - Vp}{Vc - Vp}\right) \times 100$$

การทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยา โดยใช้หลักการทางสถิติคือ "Analysis of variance" เมื่อ P-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ขั้นตอนที่ 2 : ศึกษาผลของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว มายังบริเวณที่เกิดการอักเสบเปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ

<u>การทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว มายังบริเวณที่อักเสบด้วยการฝังสำลี (Exudative model of inflammation , cotton pellet implantation)</u>

เป็นวิธีการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน อย่างหนึ่งด้วยการฝังสำลีทำให้เกิดการคั่งของของเหลวและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ เรียกว่า Inflammatory exudates ตามวิธีการของ Winter, et al. (1963); Higgs, Flower, and Vane (1979); และ Boyle and Mangan (1982) มีขั้นตอนการทดลองดังนี้คือ

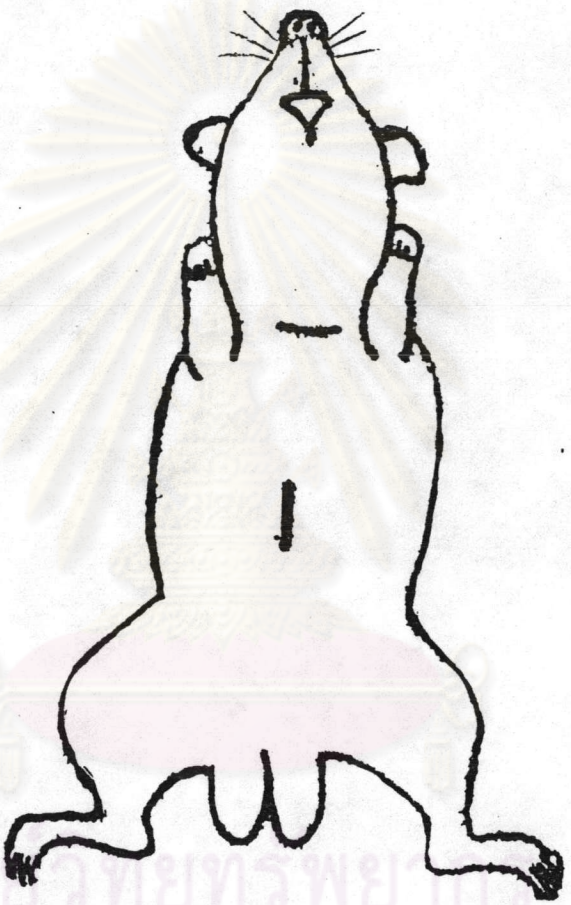
1. ชั่งน้ำหนักหนูขาว แต่ละตัว เพื่อใช้คำนวณขนาดยาที่จะให้
2. เตรียมสำลีปราศจากเชื้อโรค (Sterile) น้ำหนัก 40 $\pm$ 1 มก/ ชิ้น
3. แช่เครื่องมือผ่าตัด และเย็บแผล ในแอลกอฮอล์ 70 % นานประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรค ก่อนนำมาใช้
4. เมื่อจะทำการผ่าตัดฝังสำลีจะทำให้หนูสลบด้วยอีเธอร์ในปริมาณน้อย ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการผ่าตัดฝังสำลี และเย็บแผล
5. เช็ดผิวหนังบริเวณกลางหน้าท้องก่อนทำการผ่าตัดด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน การผ่าตัดจะตัดลึกถึงชั้นใต้ผิวหนัง (Subcutaneous) แผลยาวประมาณ 1.5 ซม. (ดังรูปที่ 6) จากนั้นจึงฝังสำลีชุบด้วย 1 % carrageenan ในสารละลาย 0.9 % sodium chloride ปริมาตร 1 มล. ต่อสำลี 1 ชิ้น
6. เย็บปิดแผล ด้วยด้ายไนล่อนสีดำ แบบ Interrupted suture ประมาณ 2-3 stiches

7. หลังจากนั้น เลี้ยงหนูตามปกติ เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จึงทำการฆ่าหนูโดยใช้อีเธอร์

8. ผ่าตัดเอาลำลีออกจากหน้าท้อง แช่ลำลีใน 10 mg % Heparinized saline ปริมาตร 5 มล./ ลำลี 1 ชิ้น แช่ไว้นานประมาณ 10 นาที จึงบีบลำลีให้แห้งแล้วนำ specimens ที่ได้นี้ ไปนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยใช้ hemacytometer ชนิด " Bright-Line " Counting Chamber เป็นเครื่องมือที่ใช้นับจำนวน เซลล์เม็ดเลือดขาว

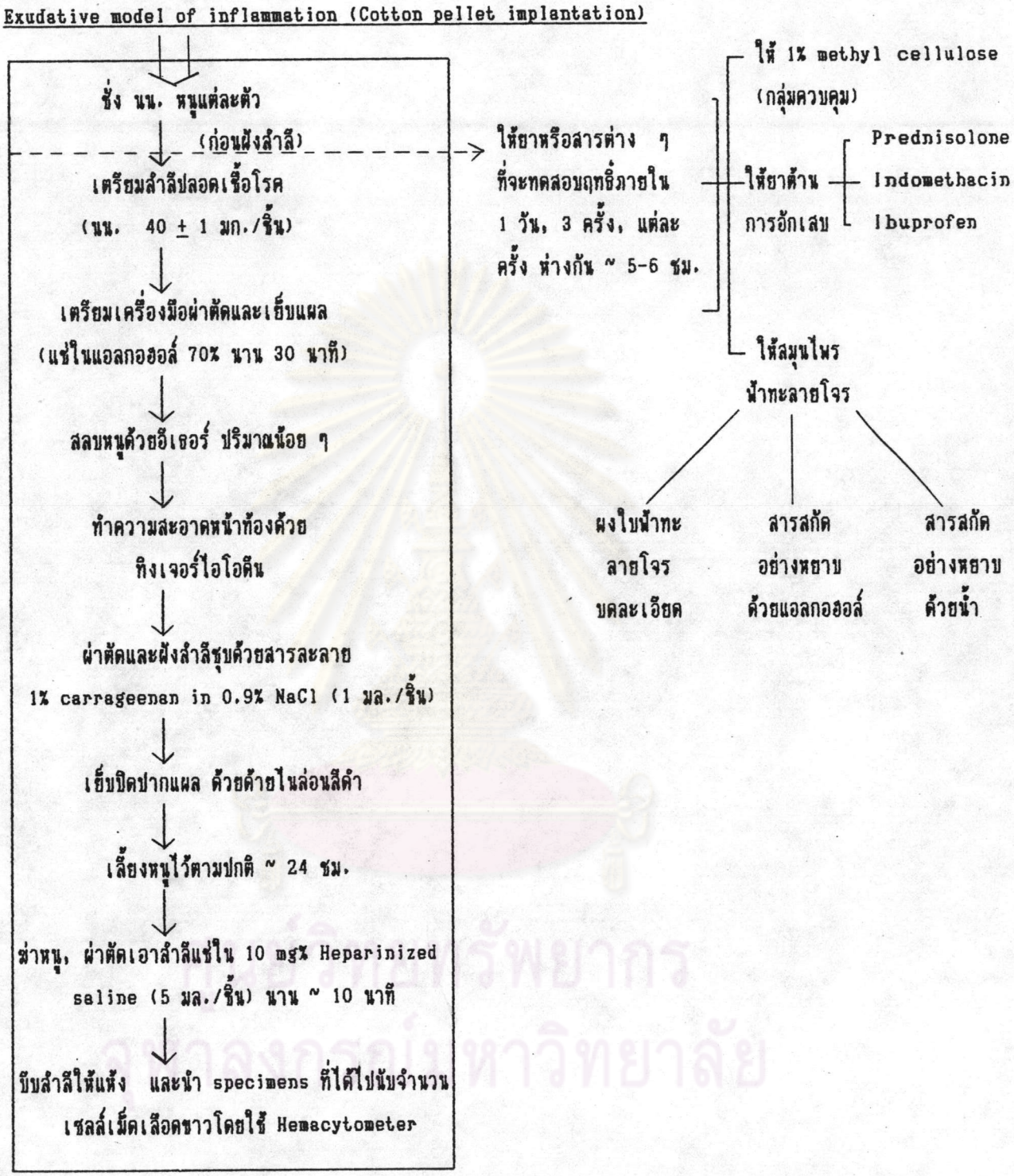
9. ในกรณีที่จะทดสอบฤทธิ์ของยา หรือสารอื่น ๆ ว่ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่ฝังลำลีหรือไม่ จะให้ยาหรือสารนั้น ๆ ก่อนทำการฝังลำลี แก่หนูขาวทางปากภายใน 1 วัน, โดยแบ่งให้ยา 3 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกันประมาณ 5-6 ชั่งโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 ภาพแสดงตำแหน่งที่ฝังสำลี บริเวณหน้าท้องของหนูขาว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่อักเสบด้วยการฝังสำลี (Exdative model of inflammation, cotton pellet implantation) และวิธีทดสอบฤทธิ์ของยาต้านการอักเสบ, ผงใบฟ้าทะลายโจร, สารสกัดอย่างหยาบด้วยแอลกอฮอล์ และสารสกัดอย่างหยาบด้วยน้ำ จากใบฟ้าทะลายโจร

วิธีการศึกษาทำตามแผนภูมิรูปที่ 7 โดยแบ่งหนู เป็น 4 กลุ่ม เพื่อให้ยาทางปากโดยใช้ feeding syringe การให้ยาและสารแขวนตะกอนแก่หนูแต่ละกลุ่มจะให้ภายใน 1 วัน, โดยแบ่งให้ 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันประมาณ 5-6 ชั่วโมง ปริมาตรของสารหรือยาที่ให้ไม่เกิน 10 มล./ น้ำหนักตัว 1 กก. แบ่งกลุ่มต่าง ๆ ได้ดังนี้คือ

<u>กลุ่มที่ 1</u>

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Prednisolone ขนาด 5 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Indomethacin ขนาด 5 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Ibuprofen ขนาด 10 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน ของ 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

<u>กลุ่มที่ 2</u>

ได้รับยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

<u>กลุ่มที่ 3</u>

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

<u>กลุ่มที่ 4</u>

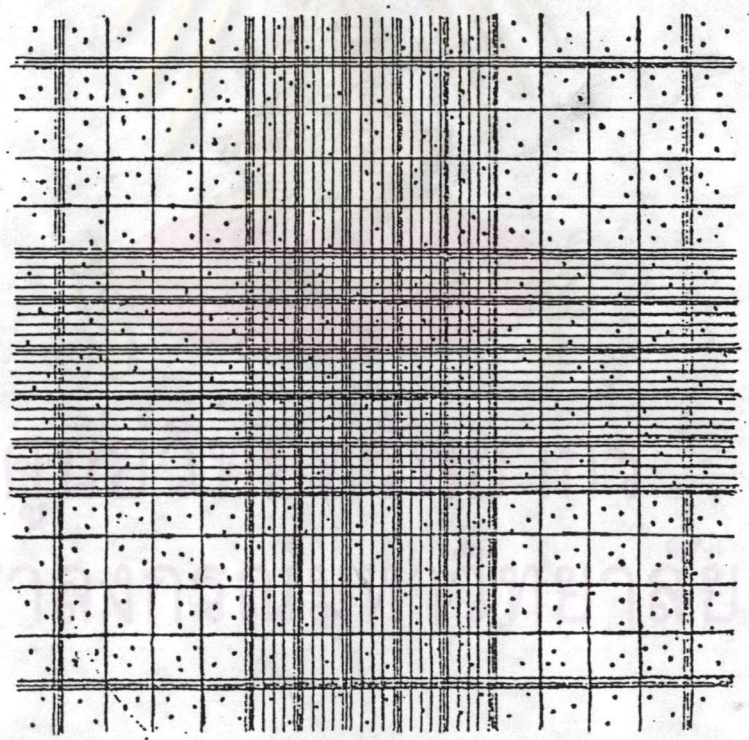
ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก / กก จำนวน 6 ตัว

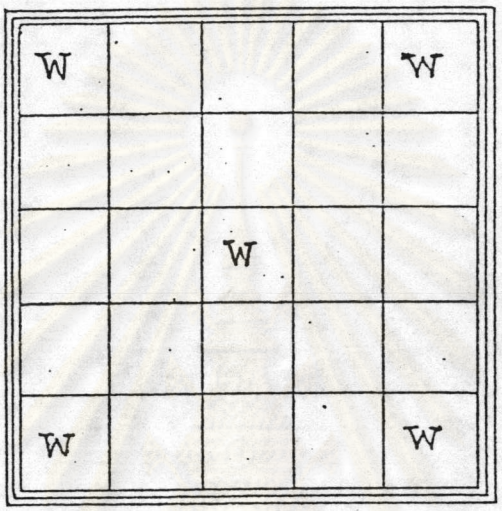
ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

วิธีการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว

ใช้ปิเปตต์ดูด specimen และหยดลงใน counting chamber ให้พอดีอย่าให้ล้นออกมานอก chamber จากนั้นนำไปส่องดูด้วย Microscope โดยเริ่มใช้ Objective lens ที่กำลังขยาย 10x เพื่อดูการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ว่ามีการกระจายตัวดีหรือไม่ ถ้ากระจายตัวไม่ดี จะมองเห็นเซลล์เกาะเป็นกลุ่มก้อน ต้องเตรียมใหม่) จากนั้นทำการเปลี่ยน Objective lens เป็นกำลังขยายที่สูงขึ้นคือ 40x ปรับโฟกัสและตำแหน่งที่จะนับให้ชัดเจนและพอดี แล้วจึงเริ่มนับเซลล์เม็ดเลือดขาวในช่องที่ใช้นับเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังรูปที่ 8 และรูปที่ 9



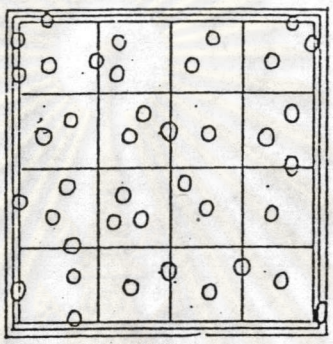
รูปที่ 8 แสดงการกระจายตัวของเม็ดเลือดใน chamber เมื่อใช้ Objective lens ที่กำลังขยาย 10x



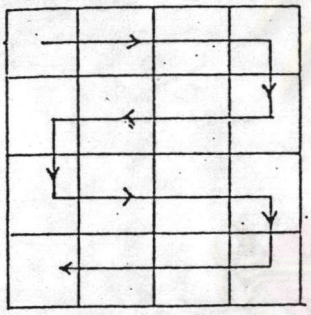
รูปที่ 9 แสดงบริเวณที่ใช้นับเม็ดเลือดขาว (ยกช่องเล็กตรงกลางซึ่งเป็นบริเวณที่จะใช้นับเม็ดเลือดขาวออกมาจากรูปที่ 8)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 9 ให้นับเม็ดเลือดขาวในช่อง ที่มี "W" รวมทั้งหมด 5 ช่องของแต่ละข้างใน Chamber ถ้าเม็ดเลือดคาบอยู่บนเส้น ให้นับ 2 ด้าน ข้างใดข้างหนึ่ง เช่น ด้านซ้ายมือกับด้านบน หรือด้านขวามือกับด้านล่าง เท่านั้น อีก 2 ด้านไม่นับ ดังตัวอย่าง แสดงวิธีการนับในรูปที่ 10



ก



ข

4	3	2	2
2	2	2	2
3	3	2	2
3	1	2	2

ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 แสดงภาพขยายของตารางเม็ดเลือดขาวและวิธีการนับ

ก. แสดงให้เห็นว่า 1 "W" ยังแบ่งเป็นช่องเล็ก ๆ อีก 16 ช่อง

ข. แสดงถึงวิธีนับ (ทิศทางการนับ)

ค. แสดงถึงจำนวนของเซลล์ที่นับได้ในแต่ละช่อง

การคำนวณ

บริเวณด้านหนึ่งของแต่ละช่องที่ใช้นับเม็ดเลือดขาว มีความกว้าง 0.2 มม.

ยาว 0.2 มม.

ลึก 0.1 มม.

ดังนั้นปริมาตรที่ใช้นับใน 1 ช่อง คือ 0.2 x 0.2 x 0.1 = 0.004 ลบ.มม

นับเม็ดเลือดทั้งหมดรวม 5 ช่อง

ดังนั้นปริมาตรรวมทั้งหมด คือ 0.004 x 5 = 0.02 ลบ.มม.

นำเข้าเทียบบัญญัติไตรยางค์ ดังนี้

ปริมาตร 0.02 ลบ.มม นับเม็ดเลือดขาวได้ X เซลล์

ปริมาตร 1 ลบ.มม นับเม็ดเลือดขาวได้ $\frac{X}{0.02}$ เซลล์

specimens ที่ใช้นับมีปริมาตร 5 มล. = 5×10^3 ลบ.มม.

ดังนั้นสูตรที่ใช้คิด Total cell count = $\frac{X \times 5 \times 10^3}{0.02}$ เซลล์

$= X \times 250 \times 10^3$ เซลล์

การคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือด (% inhibition) คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับได้ในกลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับได้ในกลุ่มได้รับยา}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับได้ในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

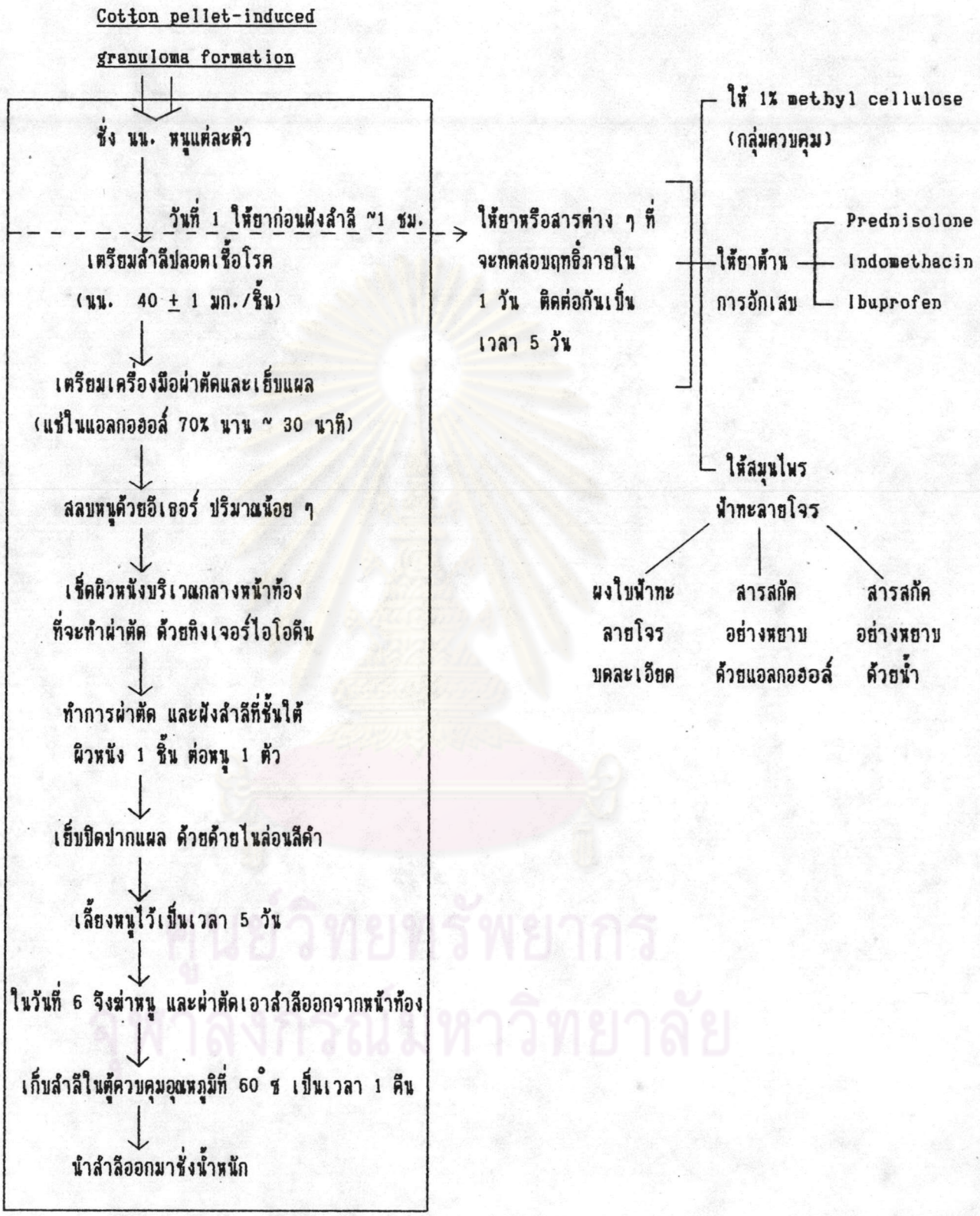
ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มได้รับยา โดยใช้หลักทางสถิติคือ "Analysis of variance" เมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ขั้นตอนที่ 3 : ศึกษาผลของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ต่อการยับยั้งการเกิด granuloma ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยวิธีการฝังสำลี เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ

การทำให้เกิดการสร้าง granuloma ด้วยการฝังสำลี
(Cotton pellet - induced granuloma formation)

ขั้นตอนนี้ เป็นการทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง โดยการฝังสำลีที่ชั้นใต้ผิวหนัง (Subcutaneous) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้าง granuloma ขึ้นตามวิธีการของ Freeman, Mangan, and Watkins (1979) มีขั้นตอนการทดลองดังนี้คือ

1. ชั่งน้ำหนัก หนูขาวแต่ละตัว เพื่อใช้คำนวณขนาดยาที่จะให้
2. เตรียมสำลีปลอดเชื้อโรค (Sterile) น้ำหนัก 40 $\pm$ 1 มก./ชิ้น
3. แช่เครื่องมือผ่าตัด และเย็บแผล ในแอลกอออล์ 70 % นานประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรค ก่อนนำมาใช้
4. เมื่อจะทำการผ่าตัดฝังสำลี จะทำให้หนูสลบด้วยอีเธอร์ในปริมาณน้อย ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการผ่าตัดฝังสำลี และเย็บแผล
5. เช็ดผิวหนังบริเวณกลางหน้าท้อง ก่อนทำการผ่าตัดด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน การผ่าตัดจะตัดลึกถึงชั้นใต้ผิวหนัง แผลยาวประมาณ 1.5 ซม. (ดังรูปที่ 6) จากนั้นจึงฝังสำลี 1 ชิ้นต่อหนู 1 ตัว
6. เย็บปิดแผลด้วยด้ายไนล่อนสีดำ แบบ Interrupted suture ประมาณ 2-3 stiches นับเป็นวันที่ 1 ของการฝังสำลี
7. เลี้ยงหนูตามปกติ เป็นเวลา 5 วัน วันที่ 6 จึงฆ่าหนูโดยใช้อีเธอร์และนำสำลีออกจากหน้าท้อง เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้น้ำ ในสำลีระเหยออกไปจนสำลีแห้ง
8. เมื่อครบกำหนด จึงนำสำลีออกมาจากตู้ควบคุมอุณหภูมิ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำสำลีมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของ granuloma
9. ในกรณีที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ของยาหรือสารอื่น ๆ ว่ามีผลต่อการสร้าง granuloma หรือไม่ จะให้ยาหรือสารนั้น ๆ ก่อนทำการฝังสำลีเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง การให้ยาหรือสารต่าง ๆ จะให้วันละ 1 ครั้งทางปากติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน จึงจะทำการฆ่าหนูแล้วนำสำลีออกมาชั่งหาน้ำหนักของ granuloma ต่อไปได้ตามวิธีการข้างต้น



รูปที่ 11 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำให้เกิดการสร้าง granuloma ด้วยการฝังสำลี (Cotton pellet-induced granuloma formation) และวิธีการทดสอบฤทธิ์ของยาต้านการอักเสบ, ผงใบฟ้าทะลายโจร, สารสกัดอย่างหยาบด้วยแอลกอฮอล์ และสารสกัดอย่างหยาบด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัยทำตามแผนภูมิรูปที่ 11 แบ่งหนูเป็น 4 กลุ่ม ให้ยาทางปากโดยใช้ feeding syringe การให้ยาและสารแขวนตะกอนแต่ละชนิด จะให้วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ปริมาตรที่ให้ไม่เกิน 10 มล / น้ำหนักตัว 1 กก. แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม ได้ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Prednisolone ขนาด 5 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Indomethacin ขนาด 2.5 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอน ของ Ibuprofen ขนาด 10 มก/กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน ของ 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

ส่วนการให้สารและยาใน กลุ่มที่ 2 , กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 ชนิดของสารและยาที่ให้ ขนาดยา และจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ เตรียมเหมือนขั้นตอนที่ 2 คือ

กลุ่มที่ 2

ได้รับยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 3

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก/ กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 4

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 200 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัดด้วยน้ำจากใบฟ้าทะลายโจร ขนาด 500 มก / กก จำนวน 6 ตัว

ได้รับสารแขวนตะกอน 1 % methyl cellulose เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว

น้ำหนัก granulomas = (น้ำหนักสำลีที่ใช้ฝังแล้วเป็นเวลา 5 วัน และระเหยน้ำออกจนสำลีแห้งแล้ว) - (น้ำหนักสำลีก่อนฝังที่หน้าท้อง)

การคำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้งการเกิด granulomas (% inhibition) คิดจาก

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{น้ำหนัก granuloma ในกลุ่มควบคุม} - \text{น้ำหนัก granuloma ในกลุ่มได้รับยา}}{\text{น้ำหนัก granuloma ในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มได้รับยา โดยใช้หลักทางสถิติคือ "Analysis of variance" เมื่อ p - value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย