

บทที่ ๓

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย



๑. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์สวิส (Swiss mice) ซึ่งเป็นหนูพันธุ์ที่หาง่ายที่สุด และ susceptible ต่อการเกิดลิวคีเมียชนิด erythroleukemia ด้วย FV โดยได้รับพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มาทำการเพาะพันธุ์แบบ Random-bred ต่อในงานสัตว์ทดลอง ฝ่ายวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ หนูเหล่านี้ถูกเลี้ยงไว้ในกรงโลหะ ได้รับน้ำและอาหารสำเร็จรูป (Gold Coin Mills, X.E. Zuelling Ltd., Singapore) ในการทดลองได้ใช้หนูทั้งสองเพศซึ่งมีช่วงอายุ ๖-๘ สัปดาห์ น้ำหนักเพศผู้ระหว่าง ๓๔-๔๕ กรัม และเพศเมียระหว่าง ๓๐-๔๐ กรัม

๒. ไวรัส

Friend leukemia virus (FV) complex (Mirand Strain) ได้รับความเชื้อเพื่อจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

๓. วิธีการเพาะเลี้ยงและหาปริมาณของไวรัส

ทำการฉีด FV ปริมาณสูง ๆ เข้าหลอดเลือดดำที่หางของหนูพันธุ์สวิสเป็นเวลา ๒-๓ สัปดาห์ หลังจากนั้นนำม้ามของหนูที่ถูกฉีดเชื่อนี้มาบดให้ละเอียดและกรองผ่านตะแกรง (coarse mesh, stainless steel screens) ขนาด ๕๐ ช่อง/ตารางนิ้ว ลงสู่ petri dish ที่มี ice cold Eagle's medium ซึ่งประกอบด้วย ๑๐% Fetal calf serum (FCS) (Grand Island Biological Company, Grand Island, New York., U.S.A.) ที่ถูกทำให้เสื่อมสภาพที่ 56°C เป็นเวลา ๓๐ นาที Penicillin G 100 unit/ml. (บริษัทคูเม็กซ์ กรุงเทพฯ ประเทศไทย) และ Streptomycin 100 ug/ml. (องค์การเภสัชกรรม กรุงเทพฯ)

ประเทศไทย) โดยทำให้เป็น ๒๐% cell suspensions จากนั้นแบ่ง cell suspensions นี้ลงไปในหลอดแก้วเล็ก (glass ampules) (Wheaton Glass Company, Millville, New Jersey., U.S.A.) ปริมาณ 1 ml/ampule แล้วนำไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนทำการทดลองได้ตรวจหาปริมาณของไวรัสโดยใช้วิธีของ Axelrad and Steeves (๔๓)

เริ่มด้วยการทำให้ stock virus นี้เจือจางในปริมาณต่าง ๆ ที่เหมาะสมแล้วฉีดแต่ละปริมาณที่เจือจางแล้วนี้เข้าหลอดเลือดดำที่หางของหนูพันธุ์สวิสขนาด 0.5 ml/mouse หลังจากนั้น ๔ วันได้ฆ่า (sacrificed) หนูทั้งหมดและ fix ม้ามใน Bouin's fixative fluid ทำการนับจำนวน foci บนผิวของม้ามซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า ๐.๕ มิลลิเมตร และเนื่องจากจำนวนของ splenic foci ที่นับได้โดยเฉลี่ยจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของไวรัสที่ฉีด ดังนั้นปริมาณของไวรัสจึงสามารถแสดงได้ในเทอมของ Focus-forming units (FFU) 1 FFU เท่ากับปริมาณของไวรัสที่ฉีดเข้าไปในหนูที่ susceptible แล้วทำให้เกิด 1 focus โดยเฉลี่ยบนผิวของม้าม

๔. สมุนไพร

๔.๑ ต้นเหงือกปลาหมอ (Acanthus illicifolius L.) เก็บจากอำเภอมะนัง จังหวัดสมุทรสงคราม ในช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นช่วงที่พืชสมบูรณ์และเติบโตเต็มที่ มีการออกดอกออกผล

๔.๒ คึบลิ (Piper longum L.) ซื้อจากร้านเวชพงศ์โอสด กรุงเทพฯ ประเทศไทย

๔.๓ พริกไทยดำ (Piper nigrum L.) ซื้อจากร้านเวชพงศ์โอสด กรุงเทพฯ ประเทศไทย

สำหรับสมุนไพรที่นำมาทำการวิจัยนี้ได้สุบส่วนที่นำมาใช้ วงศ์และสรรพคุณที่เชื่อถือได้ ไว้ในตารางที่ ๑

ตารางที่ 1 รายชื่อและส่วนของสมุนไพรที่นำมาศึกษาวิจัย

ชื่อไทย	ชื่ออังกฤษ	ชื่อทางวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้	สรรพคุณ	เอกสารอ้างอิง
ต้น เหนืออก ปลาหม้อ	Thistlelike Plant, Saltbush	<u>Acanthus illici-</u> <u>folius</u> L.	Acanthaceae	ทั้งต้น	เป็นตัวกระตุ้นและยาฝาดสมาน ขับเสมหะ แก้ไอ ลดไข้ แก้ภาวะ- ตับม้ามโต บรรเทาอาการปวดและ อ่อนเพลีย ทั้งยังเป็นยาอายุวัฒนะ ใช้รักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็ง ตับอักเสบ ปอดบวม ริดสีดวง ไข้จับสั่น ไข้รูมาติก โรคกล้ามเนื้อ หัวใจ โรคผิวหนัง เป็นต้น	๑๘, ๓๘-๔๘
ดีปลี	Indian-Long Pepper	<u>Piper longum</u> L.	Piperaceae	ผล	ใช้เป็นเครื่องเทศ ทำให้เจริญอาหาร ขับลม ขับเสมหะ แก้ไอ ลดไข้ แก้ปวด บรรเทาอาการวิงเวียน ใช้รักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็ง (ใช้ร่วมกับต้น เหนืออกปลาหม้อ) ริดสีดวง เหน็บชา โรคหัวใจ เป็นต้น	๔, ๗, ๔๓, ๔๕ ๔๘, ๔๙, ๕๗

ตารางที่ ๑ (ต่อ)

ชื่อไทย	ชื่ออังกฤษ	ชื่อทางวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้	สรรพคุณ	เอกสารอ้างอิง
พริกไทยดำ	Black Pepper, Pepper Vine	<u>Piper nigrum</u> L.	Piperaceae	ผล	เป็นตัวกระตุ้น ใช้เป็นเครื่องเทศ ทำให้เจริญอาหาร ช่วยแต่งกลิ่น และถนอมอาหาร ชับลม ชับเสมหะ ขับระดู แก้อิโ ลดไข้ แก้ปวด ใช้ รักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็ง (ใช้ร่วมกับต้น เหงือกปลาหมอ) เหน็บชา หลอดใส่วะอักเสบ โรคหืด โรคหนองใน เป็นต้น	๔,๗,๑๔,๔๓ ๔๕,๔๗,๔๘ ๕๕-๖๐

๕. วิธีการเตรียมสมุนไพร

๕.๑ ต้นเหงือกปลาหมอ (Acanthus illicifolius L.) .

นำต้นเหงือกปลาหมอที่เก็บมาได้ล้างให้สะอาด แบ่งแยกส่วนของสมุนไพรที่จะศึกษา ได้แก่ ลำต้น ใบ และราก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากแดดให้แห้ง แล้วนำแต่ละส่วนมาบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด (Standard Wiley Cutting Mill, Model 4) (Arthur Thomas Company, Philadelphia., U.S.A.) โดยใช้ร่อน (sieves) ขนาด ๑ มิลลิเมตร บด ๑ ครั้ง และขนาด ๐.๕ มิลลิเมตร บด ๒ ครั้ง ตามลำดับ

๕.๒ ดีปส์และพริกไทยดำ (Piper longum L. and Piper nigrum L.)

จัดซื้อดีปส์และพริกไทยดำที่บดละเอียดแล้ว

๖. วิธีการสกัดสมุนไพร

ทำการสกัดสมุนไพรที่ใช้ทดลองด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำ (Aqueous extract) โดยแบ่งวิธีการสกัดดังนี้

๖.๑ วิธีการสกัดต้นเหงือกปลาหมอ

นำส่วนต่าง ๆ ของต้นเหงือกปลาหมอ ได้แก่ ลำต้น ใบ ราก และส่วนทั้งหมด ของต้นที่บดละเอียดแล้วในแต่ละส่วนมาละลายในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดในปริมาณ 0.0666 g dry wt./ml แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันประมาณ ๑๕ นาที จากนั้นกรองผ่านตะแกรง (coarse mesh, stainless steel screens) ขนาด ๕๐ ช่อง/ตารางนิ้ว เพื่อให้ได้น้ำยาสกัดตามต้องการ

๖.๒ วิธีการสกัดส่วนผสมของต้นเหงือกปลาหมอ ดีปส์ และพริกไทยดำในอัตราส่วน ๒:๑:๑

เตรียมน้ำยาสกัดของต้นเหงือกปลาหมอในทำนองเดียวกับ ๖.๑ จากนั้นนำส่วนผสมของดีปส์และพริกไทยดำที่บดละเอียดแล้วในอัตราส่วน ๑:๑ โดยแต่ละส่วนหนักเพียงครึ่งหนึ่งของต้นเหงือกปลาหมอ (เท่ากับ 0.0333 g dry wt.) มาละลายกับน้ำยาสกัดของต้นเหงือกปลาหมอ

ที่เตรียมแล้วนี้ จากนั้นใช้แทงแก้วคนให้เข้ากันประมาณ ๑๕ นาที แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด ๕๐ ช่อง/ตารางนิ้ว เพื่อให้ได้น้ำยาสกัดตามต้องการ

๖.๓ วิธีการสกัดส่วนผสมของดีปัสและพริกไทยดำในอัตราส่วน ๑:๑

นำดีปัสและพริกไทยดำที่บดละเอียดแล้วและหนักอย่างละครึ่งหนึ่งของต้น เจริงปลาหม้อ (เท่ากับ 0.0333 g dry wt.) มาละลายในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดในปริมาณ 0.0666 g dry wt./ml แล้วใช้แทงแก้วคนให้เข้ากันประมาณ ๑๕ นาที จากนั้นกรองผ่านตะแกรงขนาด ๕๐ ช่อง/ตารางนิ้ว เพื่อให้ได้น้ำยาสกัดตามต้องการ

เมื่อต้องการนำน้ำยาสกัดไปใช้ทดลองจะต้องเตรียมขึ้นใหม่ทุกครั้ง เพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ และการให้ยากระทำได้โดยการป้อนน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดให้แก่หนูพันธุ์สวิสผ่านเข้ากระเพาะอาหารโดยตรงทาง polyethylene tube (Becton Dickinson and Company, Parsippany, New Jersey., U.S.A.) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๐.๐๓๔ นิ้ว ในปริมาณน้ำยาสกัด 0.2 ml/mouse/day เพื่อตรวจหาพิษในหนูพันธุ์สวิสปกติและผลต่อต้านลิวคีเมียชนิด erythroleukemia ในหนูพันธุ์สวิสที่ทำให้เกิดโรคด้วย FV ซึ่งน้ำยาสกัดต่าง ๆ ที่เตรียมแล้วนี้มีปริมาณของตัวยาสมุนไพรมะละชิดดังนี้

ในกรณีที่ใช้ยาสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้น เจริงปลาหม้อและส่วนทั้งหมดของต้นที่ไม่ได้ผสมร่วมกับดีปัสและพริกไทยดำจะมีปริมาณเท่ากับ 0.0133 g dry wt./mouse/day แต่ถ้าใช้ยาสกัดดังกล่าวผสมร่วมกับดีปัสและพริกไทยดำในอัตราส่วน ๒:๑:๑ จะประกอบด้วยปริมาณของต้น เจริงปลาหม้อเท่ากับ 0.0133 g dry wt./mouse/day ดีปัสและพริกไทยดำอย่างละเท่ากับ 0.0066 g dry wt./mouse day และหากใช้เฉพาะน้ำยาสกัดส่วนผสมของดีปัสและพริกไทยดำในอัตราส่วน ๑:๑ จะมีปริมาณอย่างละเท่ากับ 0.0066 g dry wt./mouse/day

ขณะเดียวกันนี้หนูในกลุ่ม control จะถูกป้อนด้วยน้ำกลั่นที่ใช้สกัดยาในปริมาณ 0.2 ml/mouse/day ควบคู่ไปด้วย

๗. วิธีการตรวจดูพยาธิสภาพของอวัยวะภายในต่าง ๆ แบ่งเป็น ๒ ขั้นตอน ดังนี้

๗.๑ ตรวจดูพยาธิสภาพของอวัยวะภายในที่ปรากฏให้เห็นด้วยตาเปล่า (Gross morphological features) ทำการผ่าซาก (autopsy) หนูพันธุ์สวิสที่อุกนํามาทำการทดลองทุกตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และที่ตายระหว่างช่วงการทดลองเพื่อตรวจดูพยาธิสภาพของอวัยวะภายใน ดังเช่นที่หัวใจ ตับ ม้าม ไต ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ ระบบโลหิต และระบบสืบพันธุ์ ซึ่งพยาธิสภาพที่สามารถตรวจพบได้ด้วยตาเปล่าได้แก่ รูปร่างและขนาดของอวัยวะที่ผิดปกติ โดยมีรูปร่างเปลี่ยนไปจากปกติและอาจมีขนาดใหญ่หรือเล็กลง บางครั้งอวัยวะที่ผิดปกตินี้อาจพบว่ามีลักษณะ firm เลือดมาเลี้ยงมากขึ้น (hyperemia) บวม (edema) หรือตรวจพบถุงน้ำ (cyst) และก้อนเนื้องอก (tumor) นอกจากนี้เนื้อเยื่อบางแห่งของอวัยวะอาจเกิด infarction ขึ้น เป็นต้น เมื่อตรวจพบพยาธิสภาพดังกล่าวที่อวัยวะใด จะต้องทำการศึกษาโดยละเอียดในขั้นที่ ๒ ต่อไป

๗.๒ ตรวจดูพยาธิสภาพของอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological features) นำอวัยวะภายในตรงบริเวณที่ตรวจพบพยาธิสภาพในขั้นแรกมาศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาโดยอาศัย histological techniques (๑๔๐) ได้แก่ fixation, dehydration and clearing, wax embedding, cutting and mounting section และ staining ตามลำดับ ซึ่ง section ดังกล่าวจะถูกย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจดูพยาธิสภาพต่อไป (๑๔๑)