# บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### สัตว์ทดลอง

หนูขาว (Wistar rat) อายุ 7-สัปดาห์-เพศผู้ 105 ตัวและเพศเมีย 105 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ วิทยาเขตศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล หนูทั้งหมดนำมาพักไว้ในห้องสัตว์ทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25±1 °C 8วามชื้นสัมพัทธ์ 60 % เพื่อให้คุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อม (acclimatization) โรงเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ณ.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หนูทั้งหมดได้รับอาหารเม็ดสูตรมาตรฐานจากบริษัท CP จำกัด (ประเทศไทย) และให้น้ำแบบ ad libitum

### สารเคมี

สารสกัดรางจืดโดยโดยน้ำสกัดได้รับอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ NaCl, KCl จากบริษัท Sigma Chemical จำกัด (ประเทศอเมริกา)

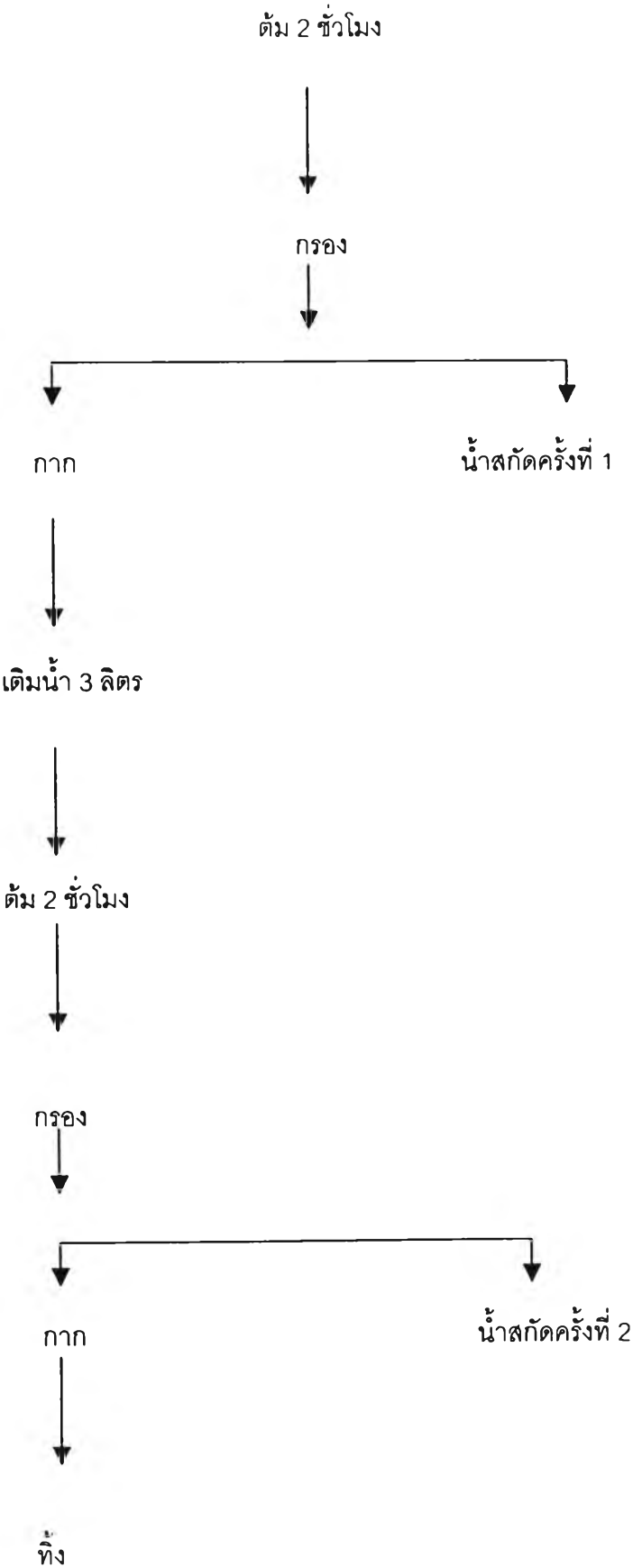
### วิธีทำการทดลอง

1. **การเตรียมสารสกัดรางจืดโดยใช้น้ำสกัด**

ผงแห้งของรางจืด 300 กรัม

↓ เติมน้ำ 3 ลิตร

I 21454800


ต้ม 2 ชั่วโมง
กรอง
กาก
น้ำสกัดครั้งที่ 1
เติมน้ำ 3 ลิตร
ต้ม 2 ชั่วโมง
กรอง
กาก
น้ำสกัดครั้งที่ 2
ทิ้ง

น้ำสกัดครั้งที่1 และ 2



ระเหยโดยใช้เครื่องระเหยที่อุณภูมิ 60°C



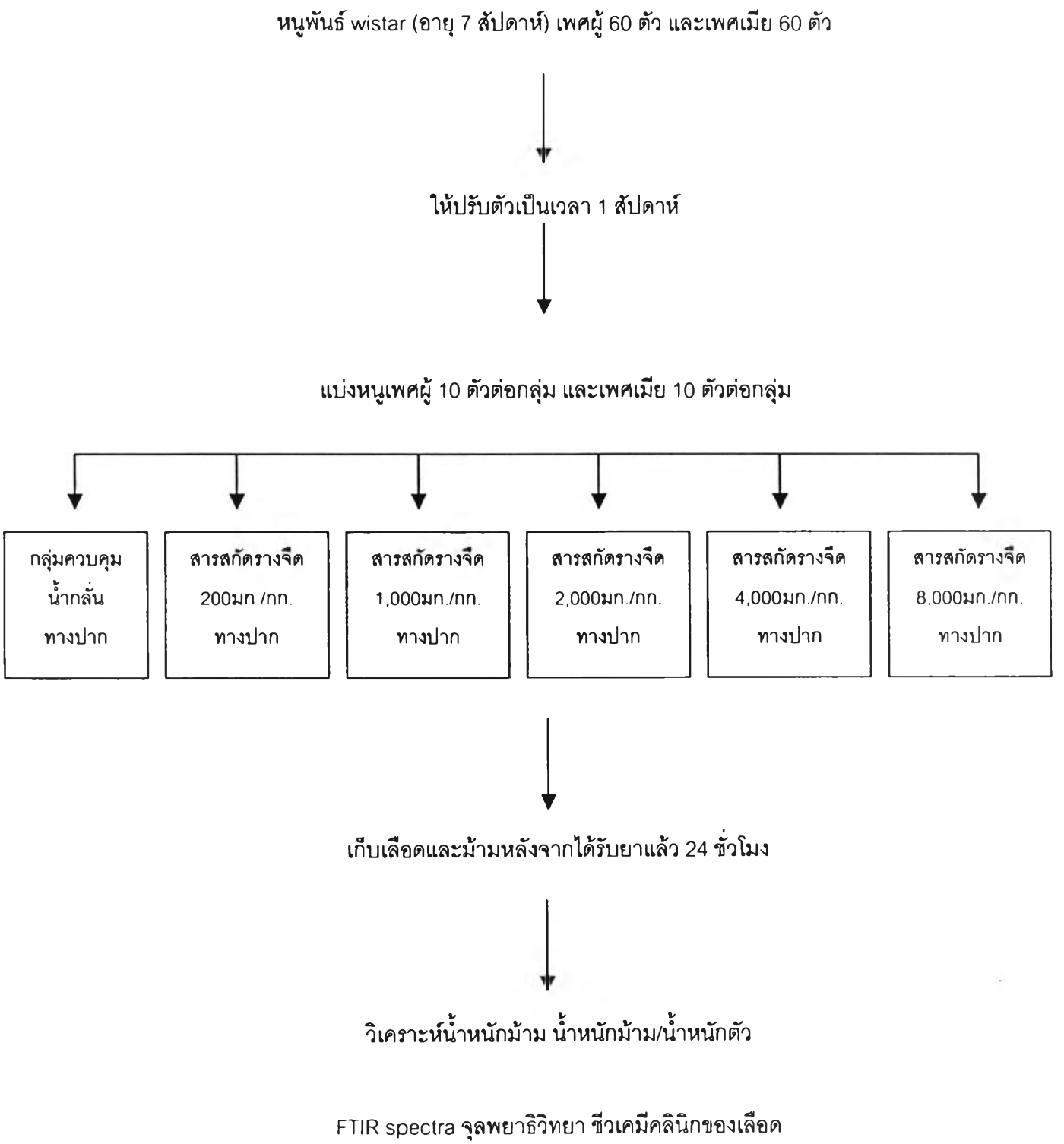
ผงสารสกัดรางจืดซึ่งสกัดด้วยน้ำ เก็บที่อุณภูมิ – 20°C

ได้สารสกัด 25.47 % ของผงแห้งของรางจืด

**2.การทดสอบผลเฉียบพลันของสารสกัดรางจืดที่มีผลต่อม้ามของหนู**

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินและสืบค้นผลเฉียบพลันของสารสกัดรางจืดที่มีผลต่อเซลล์ม้ามของหนูโดยเปรียบเทียบกราฟ FTIR กับจุลพยาธิวิทยาและชีวเคมีของเลือด

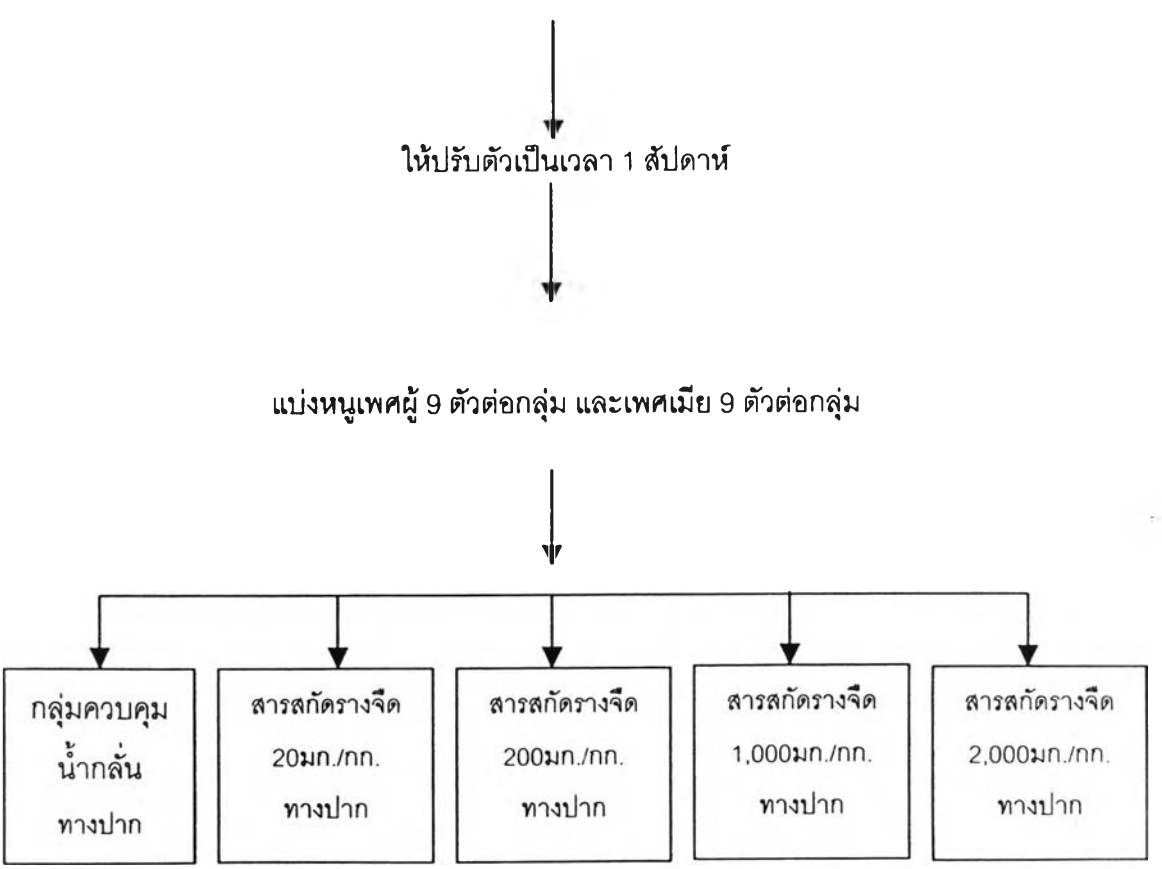
**การออกแบบการทดลอง**



ภายหลังได้รับการปรับตัว แบ่งหนูเพศผู้ 60 ตัว และเพศเมีย 60 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ในแต่ละเพศ กลุ่มควบคุมให้น้ำกลั่นโดยทางปาก กลุ่มที่ให้สารสกัด 5 กลุ่มของแต่ละเพศให้สารสกัดรางจืดที่ 200 , 1000, 2000, 4000 และ 8000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ทางการรับประทาน แต่ละกลุ่มทำการฆ่าโดย diethyl ether จากนั้นทำการเก็บม้าม ชั่งน้ำหนัก ทำการเตรียมเซลล์ม้ามสำหรับวัด FTIR Spectrum และนำไปทำจุลพยาธิวิทยา เก็บเลือดจากเส้นเลือด inferior vena cava เพื่อทำการตรวจวัดชีวเคมีคลินิกในเลือด

3. **การทดสอบผลการได้รับสารแบบกึ่งเรื้อรังของสารสกัดรางจืดที่มีผลต่อม้ามของหนู**

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินและสืบค้นผลอย่างกึ่งเรื้อรังของสารสกัดรางจืดที่มีผลต่อเซลล์ม้ามของหนูโดยเปรียบเทียบกราฟ FTIR กับจุลพยาธิวิทยาและชีวเคมีของเลือด



เก็บเลือดและม้ามหลังจากได้รับยาแล้ว 24 ชั่วโมง

วิเคราะห์น้ำหนักม้าม น้ำหนักม้าม/น้ำหนักตัว

FTIR spectra จุลพยาธิวิทยา ชีวเคมีคลินิกของเลือด

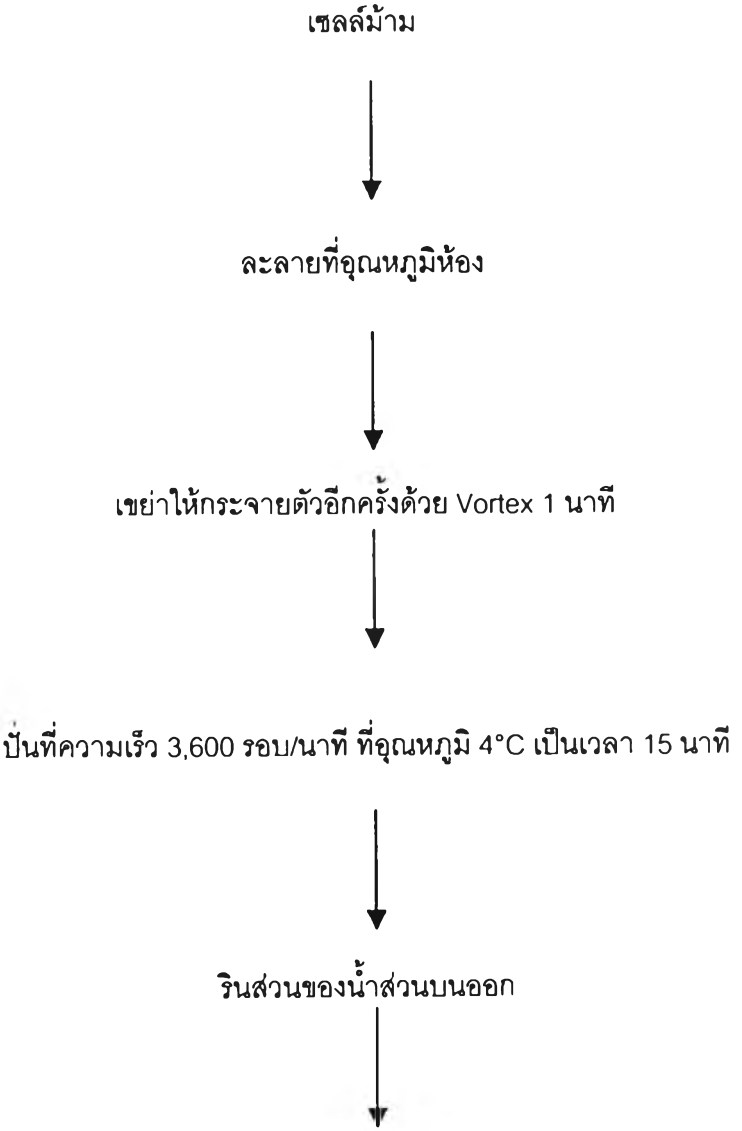
ภายหลังให้หนูปรับตัว แบ่งหนูเพศผู้ 45 ตัว และเพศเมีย 45 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ในแต่ละเพศ กลุ่มควบคุมให้น้ำกลั่นโดยทางปาก กลุ่มที่ให้สารสกัด 5 กลุ่มของแต่ละเพศให้สารสกัดรางจืดที่ 20 , 200, 1000, 2000 และ 4000 มก. /กก. ทางปาก แต่ละกลุ่มทำการฆ่าโดย Diethyl ether จากนั้นทำการเก็บม้าม ชั่งน้ำหนัก ทำการเตรียมเซลล์ม้ามสำหรับวัด FTIR Spectrum และนำไปทำจุลพยาธิวิทยา เก็บเลือดไปทำการตรวจวัดชีวเคมีคลินิกในเลือด

**ขั้นตอนการคัดแยกเซลล์ม้าม**(Suramana *et al.*, 2001)

ตัวอย่างเซลล์ม้ามถูกคัดแยกจากชิ้นเนื้อม้ามโดยการขูดโดยใช้ Spatula จากชิ้นม้ามของหนูแต่ละตัว และใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอดต่อตัว ที่บรรจุน้ำเกลือ 0.9% และเก็บที่อุณหภูมิ −20 °C เพื่อใช้ต่อไป

**การเตรียมเซลล์ม้าม** (Suramana *et al.*,2001)

สารแขวนตะกอนเซลล์ม้ามถูกละลายที่อุณภูมิห้องและเขย่าด้วย Vortex เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้กระจายตัวอีกครั้ง จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 3,600 รอบ/นาที ที่อุณภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทน้ำส่วนบนออก จากนั้นเติมน้ำเกลือ 0.9% ลงไป 1.0 มล. ทำการเขย่าอีกครั้ง จากนั้นก็ไปวงหลอด Microcentrifuge (ปริมาตร 1.5 มล.) จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที รินน้ำส่วนบนออก สุดท้ายจะได้เซลล์ม้ามเก็บไว้ต่อไป



ทำให้กระจายอีกครั้งโดยเติมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9% ลงไป 1.0 มล.

ถ่ายเซลล์ม้ามสู่ Microcentrifuge tube (ปริมาตร 1.5 มล.)

ปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำด้านบนออกโดยการริน

เซลล์ม้าม

**การวิเคราะห์** FTIR (Suramana *et al.*, 2001)

นำเซลล์ม้ามบน Sample holder เป่าด้วยลมเย็นจากเครื่องเป่าผม จากนั้นนำ Sample holder ไปวัดด้วยเครื่อง Nicolet Protégé 460 Fourier-transform infrared spectrometer โดย DTGS KBr detector แต่ละ spectrum แสดงความถี่ที่เปลี่ยนแปลง, อัตราส่วนในการดูดซับซึ่งจะทำการทดสอบเหมือนกันทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสาร จากนั้นทุก parameter จะถูกคำนวณโดยโปรแกรมของ Prof. Patric TT Wong (มหาลัยออตตาว่า ประเทศแคนาดา)

เซลล์ม้าม

ป้ายลงบน Sample holder

เป่า Sample holder ด้วยลมเย็นจากเครื่องเป่าผมจนแห้ง

นำ Sample holder ลงในเครื่อง FTIR เพื่อวิเคราะห์ FTIR

**อุปกรณ์**

1. Nicolet Protégé 460 Fourier Transform Infrared Spectroscopy
2. Hitachi high speed refrigerated centrifuge
3. Refrigerated centrifuge
4. Freezer with -70°C
5. Freezer with -20°C
6. Automatic pipette
7. Eppendol tubes

8. 50 ml plastic centrifuge tubes

9. Pasteur pipette

**สารเคมี**

ชั่งน้ำหนัก NaCl จำนวน 9.0 g ละลายในน้ำ 1 ลิตร

**ขั้นตอนการตรวจสอบจุลพยาธิของม้าม**

การเตรียมจุลพยาธิวิทยาของม้าม เตรียมโดยสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขโดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

นำม้ามแช่ใน 10% neutral buffed fomalin จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดย นำเนื้อเยื่อแช่ใน alcohol 70% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่ใน 95% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 2 ครั้ง จากนั้นแช่ใน alcohol 100% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 2 ครั้ง จากนั้นทำการ cleaning โดยแช่ใน Xylene เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 2 ครั้ง จากนั้นแช่ใน paraffin เหลว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 2 ครั้ง จากนั้นนำม้ามฝังใน paraffin เหลว ทำให้เป็น block จากนั้นตัดเนื้อเป็นขนาด 5 ไมโครเมตร แล้วนำไปย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin จากนั้นทำการวิเคราะห์จุลพยาธิวิทยาของม้ามโดยนักสัตวพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ขั้นตอนการเตรียมเลือด**

ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือด Inferior vena cava ใส่ในหลอดทดลองที่มี EDTA. ในสัดส่วน 1.5 มิลลิกรัม./ เลือด 1 มิลลิลิตร. จำนวน 2 หลอด จากนั้นนำหลอดที่1 ปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บน้ำส่วนบนซึ่งเป็น Plasma นำ Plasma ไปทำการทดสอบค่าทางชีวเคมี นำหลอดที่2 ไปทำการนับ White blood cell

**การวัด** Bilirubin, AST, ALT

การวัดBilirubin, AST, ALT ทำการวัดโดยใช้เครื่อง automate ด้วย Hitachi รุ่น912 โดยวิธี Colorimetric assay, วิธี UV test, ตามลำดับ

**ปัญหาทางจริยธรรม**

ขั้นตอนการวิจัยในสัตว์ทดลองผ่านคณะกรรมการจริยธรรมของการวิจัยในสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

ผลการทดลองแสดงด้วยค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับ wavenumber ($cm^{-1}$), สัดส่วนการดูดซับ, น้ำหนักม้ามต่อน้ำหนักตัวหนู, ค่าปริมาณ bilirubin, ค่าปริมาณ AST, ค่าปริมาณ ALT โดยใช้ ANOVA test Dunnett multiple range test (Maines *et al.*, 1999) ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ