บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

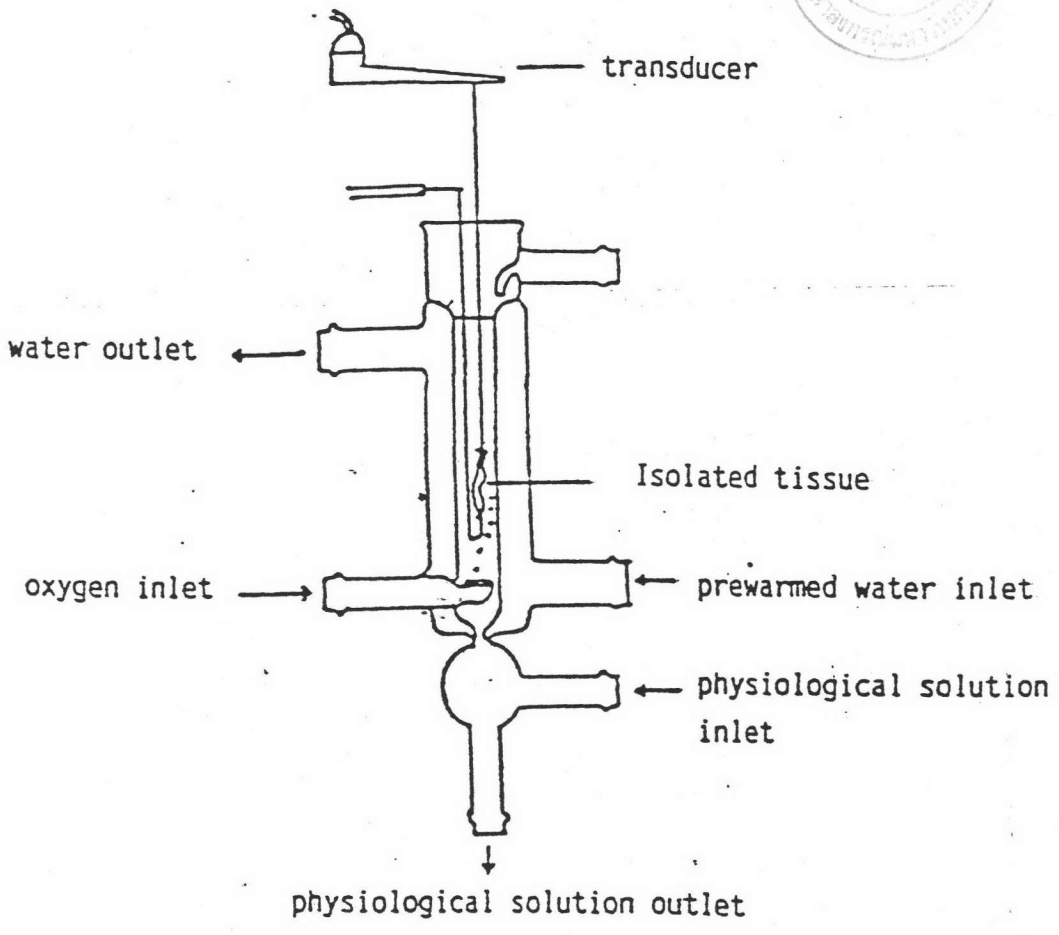
1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทพันธุ์ Wistar เพศเมีย อายุประมาณ 2-3 เดือน น้ำหนักประมาณ 200-230 กรัม จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงไว้ในกรงและห้องที่ควบคุมแสงสว่าง (สว่าง 12 ชั่วโมง: มืด 12 ชั่วโมง) ควมคุมอุณภูมิ 28° ซ ได้รับอาหาร standard commercial diet และน้ำ ad libitum นำหนูที่เตรียมจาก virgin female rat ที่มีรอบการเป็นสัดเป็นปกติ ไปผสมพันธุ์ในระยะ proestrus หลังจากผสมพันธุ์แล้วเช้าวันรุ่งขึ้นจึงทำ vaginal smear เพื่อดู sperm โดยนับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้อง แยกหนูที่ตั้งท้องออกโดยแยกกรงออกจากกัน ซึ่งหนูแรทจะมีการคลอดลูกประมาณวันที่ 22 หลังจากตั้งท้อง

2 เครื่องมือ

2.1 Isolate organ bath ประกอบด้วย double wall Harvard "Bennett-type" ต่อกับ double-jacketed glass organ bath ซึ่งเป็นหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) คือน้ำยา van Dykes Hasting buffer โดยจะไหลผ่าน double wall Harvard เข้ามาอยู่ใน double-jacketed glass organ bath ซึ่งมีความจุประมาณ 20 มิลลิลิตร ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ 37° ซ. โดยมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำคอยควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ซึ่งส่งน้ำให้ไหลเข้าและออกในชั้นนอกอย่างสม่ำเสมอ ใน double-jacketed glass bath ยังมีช่องเปิดให้อากาศซึ่งประกอบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และออกซิเจน 95% ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นในได้ (ดังรูปที่ 3)

2.2 ชุดควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump Churchill type) (Grant instruments, Cambridge; England)



รูปที่ 3 เครื่องมือ isolate organ bath

018777

2.3 เครื่องวัดการหดตัว isotonic force tranducers ของ Gould / Statham T-UC 3 และ T-UL 5

2.4 เครื่องบันทึกผลการทดลอง RM Dynograph recorder ของ Beck, U.S.A.

2.5 Blender

2.6 Rota vapour

2.7 Thin-layer chromatography

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีใช้สำหรับกระตุ้นให้กล้ามเนื้อมดลูกหดตัวได้แก่

- (±) Arterenal Norepinephrine Hydrochloride $C_8H_{11}NO_3HCl$ (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, U.S.A.)
- Prostaglandin F_{2a} $C_{20}H_{34}O_5C_4H_{11}NO_3$ (Sigma, U.S.A.)
- Calcium chloride $CaCl_2\ 2H_2O$ (Merck, Germany)

3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นสารยับยั้งการหดตัวมดลูก (โดยยับยั้งฤทธิ์ของสารกระตุ้นในข้อ 3.4 เพื่อเปรียบเทียบกับอัลลิซิน) ได้แก่

- Prazosin hydrochloride $C_{19}H_{21}N_5O_4 \cdot HCl$ (Sigma, U.S.A.)
- Yohimbine hydrochloride $C_{21}H_{26}N_3O_3 \cdot HCl$ (Sigma, U.S.A.)
- Indomethacin $C_{19}H_{16}ClNO_4$ (Sigma, U.S.A.)
- Verapamil hydrochloride $C_{27}H_{38}N_2O_4$ (Isoptin®, Knoll, Germany)
- Nifedipine $C_{17}H_{18}N_2O_6$ (Bayer, U.K.)
- Chlorpromazine hydrochloride $C_{17}H_{19}ClN_2S$ (Sigma, U.S.A.)
- EDTA (Ethylene diamine NNN'N'tetraacetic acid (ABM Chemical, U.K.)

3.3 สารเคมีใช้หาปริมาณอัลลิซินในกระเทียมที่สกัดออกมาโดยวิธี Gas chromatography

- Allyl disulfide $C_6H_{10}S$ (Sigma, U.S.A.)

3.4 สารเคมีที่ใช้เตรียม physiological solution คือน้ำยา van Dykes-Hasting มีดังนี้

NaCl (Merck, Germany)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck, Germany)
KCl (B.D.H. Chemical, England)	$NaHCO_3$ (Merck, Germany)
Na_2HPO_4 (Baker, England)	D(+)-Glucouse (Merck, Germany)
NaH_2PO_4 (Merck, Germany)	(ปริมาณดังแสดงในตารางที่ 3)

4 การเตรียมอัลลิซินจากกระเทียม

เตรียมอัลลิซินจากกระเทียม โดยใช้วิธีการสกัดจากวิธีของโรงงานเภสัชกรรมทหาร (2527) ดังต่อไปนี้

4.1 ใช้กระเทียมสดแกะกลีบแยกส่วนที่ฝอทิ้งไป นำไปล้างน้ำให้สะอาดและผึ่งไว้ให้แห้งเพื่อลดความชื้นลงให้มากที่สุด

4.2 นำกระเทียม 100 กรัม ในคลอโรฟอร์ม 120 มิลลิลิตร ไปปั่นด้วย blender จนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

4.3 แยกส่วนกากและตะกอนออกโดยการกรองโดยการกรองด้วยผ้าขาวบางพับหนา 4 ทบ และใช้ separator แยกคลอโรฟอร์มและน้ำซึ่งมีอยู่ในหัวกระเทียมสดออกมา โดยอัลลิซินจะละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม เมื่อใช้ separator แยกพบว่าคลอโรฟอร์มอยู่ชั้นล่าง ส่วนน้ำแยกอยู่ชั้นบน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 อีกครั้งหนึ่งเพื่อเอากากของกระเทียมที่เหลืออยู่ออก

4.4 แยกคลอโรฟอร์ม ออกด้วย rota vapourization ที่อุณหภูมิ 55° ซ.

4.5 ทดสอบ crude oil ด้วยวิธี thin-layer chromatography โดยใช้สารละลายเมธานอล: คลอโรฟอร์ม (3:1) เป็นตัวพา และใช้ซิลิกาเจล 60 GF-254 (Merck) ตรวจสอบหาสารอัลลิซินด้วย UV detector จะได้ค่า relative flow (R_f) เท่ากับ 0.74 (ค่าปกติอยู่ระหว่าง 0.70-0.75)

4.6 เติม povidone 1.2 กรัม เพื่อทำหน้าที่เป็น preservatives ซึ่งการเก็บรักษาโดยวิธีนี้จะทำให้อัลลิซินมีความคงตัวประมาณ 1 ปี และเก็บรักษาในที่มีอุณหภูมิต่ำ

4.7 นำไปหาปริมาณอัลลิซินอีกครั้งหนึ่งโดยใช้วิธี Gas Chomatographic Analysis (ณ ศูนย์วิจัยเครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เพื่อหาปริมาณของสาร diallyl disulfide ในกระเทียม ปริมาณของสาร diallyl disulfide สามารถคำนวณออกมาในรูปของ allyl disulfide เพราะเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง

ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของสาร van-Dykes-Hasting buffer

สารเคมี	ปริมาณ (Millimolar)
NaCl	110
KCl	6
Na_2HPO_4	0.2
NaH_2PO_4	0.8
$CaCl_2$	0.5
$NaHCO_3$	30
D(+)-Glucose	28
H_2O 1000 ml pH = 7.4	

Gas 95% O_2; 5% CO_2; อุณหภูมิ 37° ซ.

วิธีการ Gas Chromatographic Analysis เป็นการหาปริมาณของสารประกอบซัลเฟอร์ที่ระเหยได้ในกระเทียมเกิดจากปฏิกิริยาของเอนซัยม์กับสารตั้งต้นเป็น flavour ขณะที่เซลล์แตกตัวออกมา ตามด้วยการเปลี่ยนแปลงต่อไปอีก จนในที่สุดได้เป็น mono-, di-, tri- และ polysulfide เป็นต้น การหาปริมาณสารเหล่านี้จะใช้ตัวอย่างมา incubate ในน้ำ 60° ซ. เป็นเวลา 30 นาที ก่อนฉีดเข้าไปในเครื่อง Gas Chromatography ซึ่งมีความรวดเร็วแม่นยำ และมีความไวสูงใช้สำหรับหาปริมาณของสารที่ระเหยได้ ส่วนสารอื่น ๆ ที่ไม่ระเหย และปะปนอยู่จะไม่รบกวนการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังสามารถปรับสภาพของอุณหภูมิ และความดันให้คงที่ (กฤษณา ไกรสินธุ์, 2528)

ขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้ (กฤษณา ไกรสินธุ์, 2528)

บรรจุ sample vial ซึ่งเป็นอัลลิซินสกัดจากกระเทียมในคลอโรฟอร์ม แล้วนำมา incubate ในน้ำแล้วใส่ใน magazine ที่ตั้งอุณหภูมิเอาไว้ 60° ซ. เป็นเวลา 30 นาที ก่อนฉีดเข้าไปในเครื่อง Gas Chromatography ที่มีสาร standard organic sulphur compound ที่มีความบริสุทธิ์สูงมากคือ allyl sulfide ใช้เป็นตัวกำหนดตำแหน่งของ peak ซึ่งขึ้นในช่วงเวลา 4.26-4.29 จากการหาปริมาณของ diallyl disulfide ในตัวอย่างที่สกัดจากกระเทียมพบว่ามีปริมาณของ allyl sulfide มากที่สุดถึง 95.5% (1.10 mM) มีสารอื่นปะปนออกมาเล็กน้อยคือ 4.5% การทดลองนี้ได้ปริมาณของอัลลิซิน 1.10 mM

5 การดำเนินการทดลอง

5.1 การเตรียมชิ้นกล้ามเนื้อมดลูกหนูแรทเพื่อการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการทดลองนอกตัวสัตว์ (in vitro) โดยแยกเอาส่วนของมดลูกตั้งท้องออกจากตัวหนูแรท แล้วจัดให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต (physiological solution) คือน้ำยา van Dykes Hasting buffer ดังแสดงในตารางที่ 3 ศึกษาการหดตัวของมดลูกที่แยกออกมาโดยใช้มดลูกหนูแรทหลังจากตั้งท้องในระยะ 7 วัน, 14 วัน และ 21 วัน นำหนูแรทมาทำให้สลบโดยดึงกระดูกคอ (dislocate) แล้วเปิดหน้าท้องเอา uterine horn ออกมายาวประมาณ 1 ซม. แยก embryo หรือ fetus และ decidual tissue ทิ้ง แล้ววาง uterine horn ซึ่งเป็นบริเวณ implantation ลงในจานแก้วซึ่งมีน้ำยา van Dykes-Hasting buffer ผ่านด้วยออกซิเจน 95% คาร์บอนไดออกไซด์ 5%

จากนั้นผูกปลายของ uterine horn ด้วยด้าย โดยให้ปลายทั้งสองเปิดเพื่อให้สารละลาย van Dykes-Hasting ผ่านได้ ผูกปลายด้านหนึ่งติดกับแท่งแก้วนำไปใส่ลงใน double-jacketed organ bath ที่มีสารละลาย van Dykes Hasting buffer 20 มล. อุณหภูมิ 37° ซ. ปลายอีกข้างหนึ่งของมดลูกนำไปผูกกับ isotonic force tranducer ซึ่งต่อกับเครื่องบันทึก (Dynograph) ปรับให้มีความตึงตัว (tension) 1 กรัม รอให้มดลูกมีการปรับสภาพกับสิ่งแวดล้อมใหม่ (equilibration period) นาน ประมาณ 15 นาที

5.2.1 การศึกษาผลของอัลลิซินต่อการหดตัวของชิ้นกล้ามเนื้อมดลูกหนูแรทที่ตั้งท้องในในระยะ 7 วัน, 14 วัน และ 21 วัน โดยเปรียบเทียบผลของอัลลิซินที่เตรียม 1.10 mM ใช้ปริมาณ 0.2, 0.4 และ 0.8 มล. ในน้ำยา van Dykes Hasting Buffer 20 มล.

เมื่อใช้ 0.2 มล. คือปริมาณอัลลิซิน 0.22 mM

เมื่อใช้ 0.4 มล. คือปริมาณอัลลิซิน 0.44 mM

เมื่อใช้ 0.8 มล. คือปริมาณอัลลิซิน 0.88 mM

บันทึกการเปลี่ยนแปลงอัตรา (rate), ความแรง (amplitude) และ รูปลักษณ์ (form)

เมื่อทดสอบ อัลลิซินปริมาณ 0.44 mM ทำให้เกิดการหดตัวของมดลูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เป็น optimal dose ในการทดสอบต่อกลไกต่าง ๆ ของมดลูกหนูแรทที่ตั้งท้อง 21 วัน

5.2.2 เพื่อศึกษาผลอัลลิซินต่อ alpha-adrenoceptor ในหนูแรทที่ตั้งท้อง 21 วัน โดยใช้ norepinephrine (NE), prazosin และ yohimbine เนื่องจาก NE เป็นสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้น alpha adrenergic receptor ของมดลูกที่ตั้งท้อง (Bass, Phillppe and Valles, 1988) prazosin เป็น alpha-1 antagonist และ yohimbine เป็น alpha-2 antagonist (Legrand et al., 1990) โดยศึกษาต่อไปนี้

5.2.2.1 ให้ NE ขนาด 10^{-12}, 10^{-13}, 10^{-14} M ตามลำดับ เพื่อดูผลการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก เลือกความเข้มข้นของ NE ที่ทำให้มดลูกมีการหดตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เป็น standard dose แล้วล้างออก 2 ครั้ง จนกว่าการหดตัวของมดลูกหดตัวกลับคืนสู่ปกติ

5.2.2.2 เพื่อศึกษา NE ต่อ alpha-1 adrenoceptor โดยให้ prazosin ในความเข้มข้น 10^{-5} M ซึ่งมีผลต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อมดลูกหนูแรท (Legrand et al., 1990) นาน 3 นาที แล้วตามด้วย NE 10^{-13} M บันทึกการหดตัวของมดลูก แล้วล้างออก 2 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนมาสู่ปกติ

5.2.2.3 เพื่อศึกษาอัลลิซินต่อ alpha-1 adrenoceptor ให้ prazosin 10^{-5} M นาน 3 นาที แล้วตามด้วย standand dose ของอัลลิซิน บันทึกผลการหดตัวของมดลูก

5.2.2.4 เพื่อศึกษา NE ต่อ alpha-2 adrenoceptor ให้ yohimbine 10^{-5} M ทำการทดลอง เหมือนข้อ 5.2.2.2

5.2.2.5 เพื่อศึกษาอัลลิซินต่อ alpha-2 adrenoceptor ให้ yohimbine 10^{-5} M ทำการทดลองเหมือนข้อ 5.2.2.3

5.2.3 เพื่อศึกษาอัลลิซินต่อ Prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a}) โดยใช้ PGF_{2a} และ indomethacin เนื่องจาก prostaglandins (PGs) มีผลกระตุ้นการหดตัวของมดลูกในระยะตั้งท้อง โดยเฉพาะ PGF_{2a} (Forman et al., 1982) ส่วน indomethacin เป็น prostaglandin antagonists ทำให้มีการคลายตัวของมดลูกป้องกันการคลอดก่อนกำหนดมีผลทำให้ยืดระยะเวลาของการตั้งท้อง (Bass, Phillippe and Valles, 1988)

5.2.3.1 เพื่อศึกษาผลของ PGF_{2a} ต่อการหดตัวมดลูก ให้ PGF_{2a} 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} M เลือกความเข้มข้นของ PGF_{2a} ทำให้มดลูกหดตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เป็น standard dose ได้แก่ PGF_{2a} 10^{-7} M แล้วล้างออก 2 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.2.3.2 เพื่อศึกษาผลของมดลูกต่อ indomethacin ให้ indomethacin 10^{-5} M ซึ่งมีผลต่อการคลายตัวของมดลูกหนูแรท

5.2.3.3 เพื่อศึกษาผลของ PGF_{2a} ต่อ indomethacin ให้ indomethacin 10^{-5} M ซึ่งมีผลต่อการคลายตัวของมดลูกหนูแรทสัมผัสกับมดลูกหนูแรท 3 นาที แล้วตามด้วย PGF_{2a} 10^{-7} M บันทึกผลการหดตัวของมดลูกแล้วล้างออก 2 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.2.3.4 เพื่อศึกษาผลของอัลลิซินต่อ indomethacin ให้ indomethacin 10^{-7} M นาน 3 นาที แล้วตามด้วย standard dose ของอัลลิซิน บันทึกผลการทดลอง

5.2.4 เพื่อศึกษาอัลลิซินต่อ calcium-channel ของมดลูกหนูแรทที่ตั้งท้อง 21 วัน เนื่องจาก verapamil และ nifedipine เป็น calcium antagonist สามารถปิดกั้นทางเข้าของแคลเซียมจากบริเวณภายนอกเซลล์ และใช้ chlorpromazine เป็น calmodulin antagonist (Ostergard et al., 1980; Forman et al., 1982; Ballejo, Calixto and Medeiros, 1986)

5.2.4.1 ให้ nifedipine 10^{-6}, 10^{-5},10^{-4} M ตามลำดับ นาน 5 นาที เลือก nifedipine ที่ทำให้มดลูกคลายตัวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) มาเป็น standard dose ได้แก่ nifedipine 10^{-5} M แล้วล้างออก 2 ครั้ง จนกว่าการหดตัวจะกลับคืนสู่ปกติ

5.2.4.2 ให้ nifedipine 10^{-5} M นาน 5 นาที แล้วตามด้วยอัลลิซิน ซึ่งเป็น standard dose บันทึกผลการหดตัวของมดลูก

5.2.4.3 ให้ verapamil 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4} M ตามลำดับ ทดสอบเหมือนข้อ 5.2.4.1

5.2.4.4 ให้ verapamil 10^{-4} M และตามด้วยอัลลิซินทดสอบเหมือนข้อ 5.2.4.2

5.2.4.5 ให้ chlorpromazine 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2} M ตามลำดับ ทดสอบเหมือนข้อ 5.2.4.1

5.2.4.6 ให้ chlorpromazine 10^{-2} M และตามด้วยอัลลิซิน ทดสอบเหมือนข้อ 5.2.4.2

5.2.5.1 เพื่อศึกษา calcium chelator ต่อการหดตัวของมดลูก ให้ EDTA ในความเข้มข้น 1 mM นาน 5 นาที จนมดลูกคลายตัวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)แล้วตามด้วยอัลลิซิน standard dose

5.2.5.2 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมที่แตกต่างกันต่อมดลูก โดยใช้ $CaCl_2$ ในปริมาณ 0, 0.1, 0.5, 1, 2 mM ตามลำดับ บันทึกผลการทดลองหลังจากที่มดลูกมีการหดตัวคงที่แล้ว ใส่อัลลิซินในปริมาณ standard dose บันทึกผลการทดลอง

6. วิเคราะห์ข้อมูล

6.1 ใช้ค่าเฉลี่ย (mean) และ ความคลาดเคลื่อน (standard deviation; SD) ในการวิเคราะห์การหดตัวหรือการคลายตัวของมดลูกหนูแรท

6.2 ใช้ Student's paired t-test และการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance) จากการทดสอบแบบแฟกตอเรียล (factorial) 4 x 3 โดยเปรียบเทียบความแตกต่างในการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารต่าง ๆ โดยค่า P จะต้องน้อยกว่า 0.05 จึงจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ