

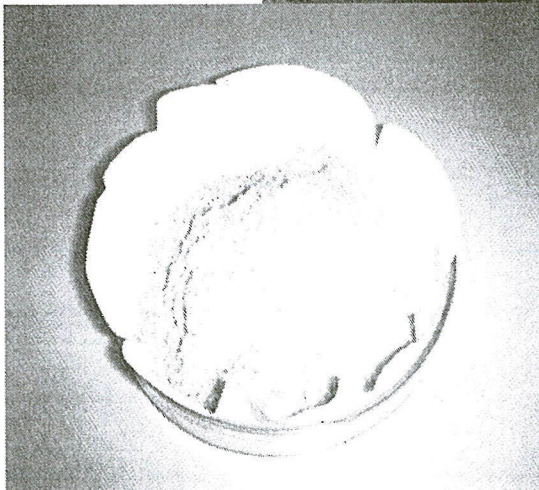
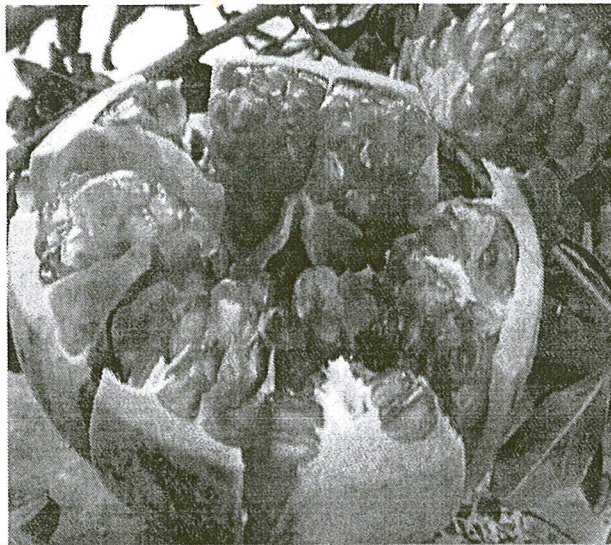
บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

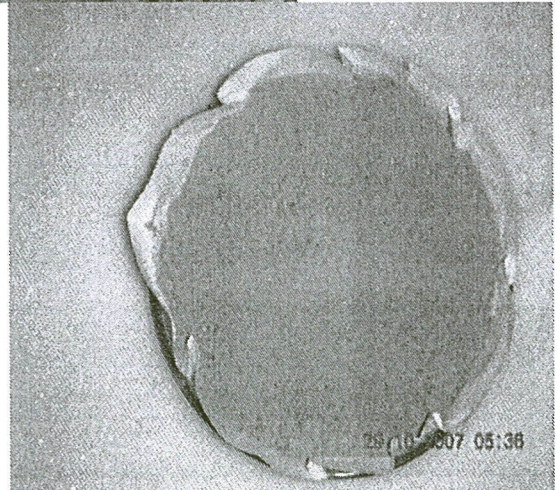
การเตรียมสารสกัดทับทิม

ทับทิมที่ใช้ในการทดลองเป็นทับทิมไทย ที่ปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา และเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนเมษายน ถึง พฤษภาคม ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (Herbarium No.080252)

(A) ผลทับทิมไทย



(B) สารสกัดเมล็ดทับทิม

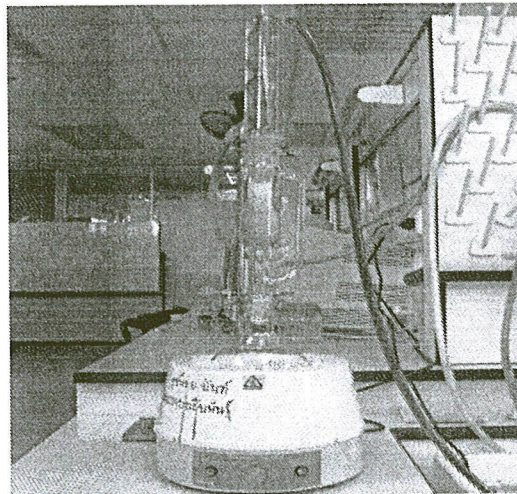


(C) สารสกัดเปลือกทับทิม

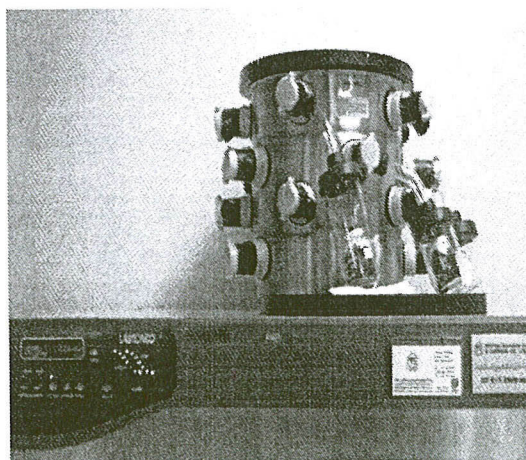
ภาพที่ 1 สารสกัดที่ได้จากส่วนของเปลือกและเมล็ดทับทิม

การเตรียมสารสกัดหัตถ์ทำได้โดย แยกเปลือกและเมล็ดออกจากกัน นำส่วนเปลือกหัตถ์ไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเมล็ดนำไปคั้นน้ำและตั้งเหี่ยวที่หุ้มเมล็ดออกให้หมดเสียก่อน ก่อนนำไปอบให้แห้งเช่นเดียวกับเปลือก เมื่อเปลือกและเมล็ดหัตถ์แห้งสนิทแล้ว นำไปบดให้เป็นผงละเอียด แล้วจึงสกัดด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนระหว่างผงเปลือกหรือเมล็ดหัตถ์ 250 กรัม ต่อ เมทานอล 1 ลิตร โดยใช้เครื่อง Soxhlet Extractor ระเหยแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator และ lyophilizer ตามลำดับ เก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สารสกัดเมล็ดหัตถ์ละลายได้ดีใน Tween-80 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และสารสกัดเปลือกหัตถ์ละลายได้ดีในน้ำกลั่น

A



B



ภาพที่ 2 เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากหัตถ์ (A) เครื่อง Soxhlet Extractor (B) เครื่อง lyophilizer

ตรวจหาสารสำคัญโดยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) โดย GC-MS เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC (Gas chromatography) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างให้ออกมาที่ละองค์ประกอบก่อนที่จะเข้าสู่ detector (Hewlett-Packard 5973) และอีกส่วนคือ เครื่อง MS (Mass spectrometry) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น detector ในการตรวจสอบดูว่าองค์ประกอบต่างๆ ที่ผ่านออกมาจากเครื่อง GC นั้น มีเลขมวล (mass number) เป็นเท่าไร เพื่อที่จะได้สามารถทำนายได้ว่าสารที่เราสนใจอยู่นั้นประกอบด้วยองค์ประกอบชนิดใดบ้าง และมีปริมาณเท่าไร (Hewlett Packard 6890)

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดตับทิมในสัตว์ทดลอง

การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศเมีย สายพันธุ์ Wistar น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม เลี้ยงสัตว์ที่อาคารสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี วิธีการเลี้ยงเป็นไปตามข้อกำหนดที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติระบุ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง การทดลองที่ 1 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการคุมกำเนิด การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารสกัดต่อเนื้อเยื่อมดลูก เต้านมและเซลล์ช่องคลอดในหนูทดลองเพศเมียที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและระดับไขมันในเลือด วิธีการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การตัดรังไข่

บรรจุหนูแรทลงในภาชนะแก้วที่มี ether ขุบสำลี (ether chamber) จนหนูสลบตีผ้าตัดรังไข่โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) โดยการจับหนูนอนคว่ำเตรียมผิวหนังบริเวณแนวกกลางหลัง ต่ำกว่ากึ่งกลางลงมาเล็กน้อย กรีดผิวหนังแนวกกลางพอดี ดึงผิวหนังไปทางด้านขวา และผ้าตัดกล้ามเนื้อขนานไปกับกระดูกสันหลัง โดยให้ห่างจากแนวกกลางตัวประมาณ 0.5 นิ้ว เมื่อพบรังไข่ ผูกขั้วของรังไข่ไว้แล้วตัดรังไข่ออก ทำเช่นเดียวกันกับรังไข่ข้างซ้าย แล้วเย็บปิดรอยผ่าที่กล้ามเนื้อและผิวหนัง ดูแลและติดตามผลการทดลองทุกวันว่าได้อาหารและน้ำพอหรือมีการติดเชื้อหรือไม่ เป็นเวลา 14 วัน

การสเมียร์ช่องคลอด

หยดน้ำเกลือ 1 หยดบนแผ่นสไลด์ จับหนูบริเวณด้านหลังขากรรไกรให้แน่นและจับบริเวณด้านหลังลำตัวหนูด้วยฝ่ามือ นำไม้ที่พัน สำลีจุ่มลงในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์และสอดเข้าช่องคลอดหนูประมาณ 5-8 เซนติเมตร ขูดเบาๆ รอบ ช่องคลอด 2-3 รอบ หลังจากนั้นกดไม้ที่สเมียร์ช่องคลอด

ลงในหยดน้ำเกลือบนแผ่นสไลด์ สเมียร์ให้ทั่ว แผ่นสไลด์อย่างสม่ำเสมอปล่อยให้ฟิล์มเยื่อช่องคลอดแห้ง จุ่มสไลด์ลงในเมธานอล เพื่อเป็นการรักษาเยื่อช่องคลอดโดยจุ่มขึ้นลง 3-4 ครั้ง จุ่มขึ้นลงในไอโซซิน ประมาณ 3-4 ครั้ง ให้น้ำยาทั่วสไลด์ จุ่มล้างในน้ำกลั่น จุ่มขึ้นลงในเมธิลีนบลู ประมาณ 15 วินาที จุ่มล้างในน้ำกลั่น ทั้งให้แห้ง ก่อนนำไปดูเซลล์ชนิดต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 1: ศักยภาพของสารสกัดในการคุมกำเนิด

ทำการสเมียร์ช่องคลอดหนูทุกวันเพื่อตรวจหาหนูที่อยู่ในระยะ estrus ซึ่งหนูจะอยู่ในระยะนี้เป็นเวลา 4 วัน ศึกษาการยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนตามวิธีของ Khanna และ Chaudhary (1968) เมื่อพบว่าหนูอยู่ในระยะ Proestrus จึงเริ่มทำการผสมพันธุ์โดยจับหนูตัวเมียไปใส่ในกรงตัวผู้ให้ตัวผู้ 1 ตัวต่อตัวเมีย 1 ตัว (monogamous) ให้อยู่ด้วยกันเป็นเวลา 24 ชม. ในตอนเช้าเมื่อครบรอบของการผสมให้สเมียร์ช่องคลอดอีกครั้งเพื่อตรวจหาเชื้อสุมิ หากพบเชื้อสุมิในช่องคลอดให้จดบันทึกไว้และนับว่าวันนั้นคือวันที่ 1 ของการตั้งท้อง และให้แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 6 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 หนูท้อง ป้อนน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 2 หนูท้อง ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมทำละลายในน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 3 หนูท้อง ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมทำละลายในน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 4 หนูท้อง ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิมทำละลายในน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 5 หนูท้อง ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิมทำละลายในน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ป้อนสารสกัดทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อถึงวันที่ 10 ของการตั้งท้องให้ทำการเมตาฆ่าตด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นผ่าตัดหน้าท้องนำส่วนของปีกมดลูกทั้ง 2 ข้างออกมาเพื่อจดบันทึกผลการทดลอง สิ่งที่ควรสังเกตคือ จำนวนการฝังตัวและพัฒนาการของตัวอ่อน นำผลการทดลองที่จดบันทึกได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนตามวิธีของ Williamson (1996)

% การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อน =

$$\frac{(\text{จำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนกลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนกลุ่มทดลอง}) \times 100}{\text{จำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนกลุ่มควบคุม}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทางสถิติจะแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M. วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วย Student's *t*-test ($P < 0.05$) (Gupta, 1978)

การทดลองที่ 2: ศึกษาผลของสารสกัดเนื้อเยื่อมดลูก เต้านม และเซลล์ช่องคลอดในหนูทดลองเพศเมียที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง

ไข่ทั้ง 2 ข้าง

แบ่งหนูตัดรังไข่ออกเป็น 8 กลุ่มๆละ 6-9 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 หนูปกติ ป้อน 10% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 2 หนูตัดรังไข่ ป้อน 10% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 3 หนูตัดรังไข่ ฉีดสารละลาย 17β -estradiol ปริมาตร 0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 4 หนูตัดรังไข่ ฉีดสารละลาย 17β -estradiol ปริมาตร 0.70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 5 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมทำละลายใน 10% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 6 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมทำละลาย 10% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 7 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิมทำละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 8 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิมทำละลายในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

หลังผ่าตัด 2 สัปดาห์ จึงเริ่มทำการฉีดและป้อนสารตามกลุ่มต่างๆเป็นเวลา 60 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำให้หนูตายอย่างสงบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งน้ำหนักตัวและจดบันทึก เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจโดยวิธีเปิด จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะได้แก่

1. มดลูก เมื่อผ่าออกมาแล้วให้ทำการชั่งน้ำหนักและจดบันทึก

$$\text{น้ำหนักมดลูกสัมพัทธ์} = (\text{น้ำหนักมดลูกเปียก/น้ำหนักตัว}) \times 100$$

2. เต้านม (mammary gland)

นำอวัยวะที่ได้นี้ไปแช่ในสารละลายฟอรัมาลีน 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อไม่ให้เน่าเปื่อย

จากนั้นนำมดลูกมาตัดตามขวาง (cross-section) และด้านมดส่วนที่แทรกตัวอยู่ในกล้ามเนื้อท้อง ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำไปฝังในพาราฟิน จากนั้นตัดพาราฟินให้มีความหนา 3 ไมโครเมตร ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) ตรวจดูลักษณะ ขนาดและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การเก็บตัวอย่างเซลล์ช่องคลอด ทำทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทางสถิติจะแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M. วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และ two-paired Student's *t*-test ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 3: ศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

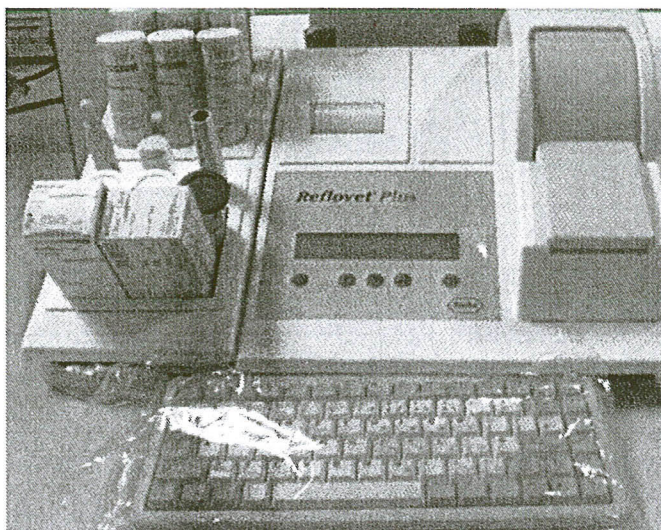
ใช้ตัวอย่างเลือดที่ได้จากการทดลองที่ 2 เพื่อเป็นการลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลอง (Reduction) ตามหลัก 3R

การตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนในเลือด

ตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมน LH และ 17 β -estradiol ด้วยวิธีการ ELISA micro well kit

การตรวจวิเคราะห์ระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมด (TC) คอเลสเตอรอลชนิดดี (HDL) คอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (LDL) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ด้วยเครื่อง Reflotron (Roch Dianostics GmbH)



ภาพที่ 3 เครื่อง Reflotron ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทางสถิติจะแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M. วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย Student's *t*-test ($P < 0.05$)