บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. พืชสมุนไพร

ใบมะรุมและใบว่านพญาวานรที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้มาจากจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งพืชทั้ง 2 ชนิดได้ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์พรรณไม้ โดยนักพฤกษศาสตร์ของสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ และเก็บตัวอย่างแห้งไว้ในหอเก็บพรรณไม้ภายใต้หมายเลข WP2614 และ WP2615 ตามลำดับ

2.สัตว์ทดลอง

หนูขาว (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุประมาณ 6 สัปดาห์ ที่มีน้ำหนักตัวระหว่าง 120-150 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

ภาพ 11 หนูขาวสายพันธุ์ Wistar (*Rattus norvegicus*)
ที่มา: http://men49sio.rr.nu/n.php?h=1&s=pmg

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

3.1 กรงสเตนเลสขนาด 36 x 22 x 15 เซนติเมตร
3.2 ขวดน้ำและจุกยางพร้อมท่อสแตนเลส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 ถุงพลาสติกสีดำ

3.4 ขี้เลื่อย

3.5 เทปกาวใส

3.6 อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด (C.P. mice feed) No. 082

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้กับสัตว์ทดลอง

4.1 เข็มป้อนสาร

4.2 กระบอกเข็มฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร

4.3 น้ำกลั่น

4.4 สารสกัดจากใบมะรุมและใบว่านพญาวานร

4.5 เครื่องชั่งแบบสปริง ชนิด 2 กิโลกรัม

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดน้ำจากใบมะรุมและใบว่านพญาวานร

5.1 ใบสดมะรุมและว่านพญาวานร

5.2 กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร

5.3 บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

5.4 น้ำกลั่น

5.5 เครื่อง vacuum rotary evaporator

5.6 ผ้าขาวบาง

5.7 โถขนาด 10 ลิตร

5.8 แท่งแก้วคนสาร

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเก็บซีรั่มและเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง

6.1 โถสลบ

6.2 Chloroform (Merck)

6.3 สำลี

6.4 เครื่องมือผ่าตัด

6.5 ถาดรองผ่าตัด

6.6 เครื่องชั่ง

6.7 eppendorf ขนาด 1.5 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.8 dropper

6.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Laboratory Centrifuge) ยี่ห้อ Gallenkamp, England

6.10 freezer - 40 ˚C ยี่ห้อ SANYO รุ่น MDF - U5410

6.11 เข็มฉีดยาเบอร์ 18

7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจนับไมโครนิวเคลียส

7.1 กรรไกรผ่าตัด

7.2 คีมตัดกระดูก

7.3 หลอดหยด

7.4 หลอดทดลอง

7.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Laboratory Centrifuge) ยี่ห้อ Gallenkamp, England

7.6 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น CX31RBSFA

7.7 Petri dish

7.8 counter

7.9 เข็มฉีดยาเบอร์ 22

7.10 แผ่นสไลด์

7.11 Normal saline 0.85%

7.13 Fetal bovine serum (Sigma)

7.14 สี Methylene blue (Sigma)

7.15 สี Eosin 0.5% (Sigma)

8. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา

8.1 แผ่นสไลด์

8.2 cell counter

8.3 Micropipette ยี่ห้อ Finnpipette รุ่น FP Focus 10-100 ul

8.4 Micropipette ยี่ห้อ Finnpipette รุ่น FP Focus 100-1,000 ul

8.5 เครื่อง High Speed Microcentrifugeยี่ห้อ Labogene รุ่น ScanSpeed 1730 MR

8.6 Hemocytometer

8.7 เครื่อง Vortex Mixer ยี่ห้อ Gemmy Industrial Corp. รุ่น VM300

8.8 หลอดทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.9 Heparinized capillary tube

8.10 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น CX31RBSFA

8.11 เครื่อง Spectrophometer รุ่น Thermo Scientific ;Genesys 20

8.12 Freezer –40°C ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-U5410

8.13 Normal Saline 0.85%

8.14 น้ำกลั่น

8.15 สารละลาย Turk's solution

8.16 สารละลาย Grower's solution

8.17 สารละลาย Drabkin's solution

8.18 Wright Giemsa stain

9. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลทางเนื้อเยื่อวิทยา

9.1 ขวดเก็บตัวอย่าง

9.2 เครื่องหลอมพาราฟินแบบควบคุมอุณหภูมิ (Selecta รุ่น 6000141)

9.3 เข็มเขี่ย (needle)

9.4 ปากคีบ (forceps)

9.5 กระดาษอะลูมิเนียม

9.6 Petri dish

9.7 กล้องจุลทรรศน์

9.8 คัตเตอร์

9.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

9.10 บล็อกพลาสติก

9.11 เครื่องตัดเนื้อเยื่อกึ่งอัตโนมัติ (SLEE 5062, MAINZ, Germany)

9.12 พู่กัน

9.13 Slides

9.14 Cover glass

9.15 Hot plate

9.16 กล่องสำหรับเก็บ Slides ขนาด 100 แผ่น

9.17 ชุดย้อมสี Hematoxylene และ Eosin

9.18 นาฬิกาจับเวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9.19 น้ำประปา

9.20 Ethanol ความเข้มข้น 70, 85, 95% และ Absolute ethanol

9.21 Bouin's solution

9.22 Xylene (ACI Labscan)

9.23 Hematoxylin (Fluka)

9.24 Eosin Y (Fluka)

9.25 น้ำยา permount

9.26 Destain (1% acid alcohol)

9.27 Stop-destain (2% ammonium hydroxide)

10. สถานที่ในการทำการวิจัย

10.1 อาคารสัตว์ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

10.2 หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ศูนย์บริการสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมและว่านพญาวานร

วิธีการสกัดจากใบมะรุมและว่านพญาวานรนั้น ขั้นตอนแรกนำใบของพืชแต่ละชนิดมาสับให้ละเอียดและนำไปแช่ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 100 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง สารสกัดที่ได้จะนำไประเหยด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator ที่ 50°C และนำไปทำ freeze dry ผลลัพธ์สุดท้ายจะได้สารสกัดเป็นผงแห้งมีสีเขียวที่เก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

สำหรับการเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมและว่านพญาวานรที่ใช้ป้อนให้กับหนูทดลองนั้น นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ข้างต้นไปละลายในน้ำกลั่น สำหรับสารสกัดจากมะรุมให้มีระดับความเข้มข้น 12, 24, 36 และ 48 mg/ml (เท่ากับขนาด 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW) และสารสกัดจากว่านพญาวานรระดับความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 mg/ml (เท่ากับขนาด 5, 10, 15 และ 20 mg/kg BW) ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการเปรียบเทียบจากความเข้มข้นที่ผู้บริโภคนิยมรับประทานเพื่อส่งเสริมสุขภาพ (ไตรภพ, 2552) โดยกำหนดที่ความเข้มข้นระดับที่ใช้จริง ต่ำกว่า 1 ค่าความเข้มข้นและมากกว่าอีก 2 ค่าความเข้มข้น (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

การเลี้ยงหนูทดลอง จะเลี้ยงในห้องที่มีเครื่องปรับอากาศควบคุมอุณหภูมิประมาณ 24 - 26 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซน 12 ชั่วโมง คือช่วงสว่างตั้งแต่เวลา 6.00 น. ถึง 18.00 น. และช่วงมืดตั้งแต่เวลา 18.00 น. ถึงเวลา 6.00 น. ให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำตามปกติตลอดระยะเวลาทำการทดลอง

ระบบเลี้ยงสัตว์ทดลองเป็นไปตามมาตรฐานการเลี้ยงสัตว์ทดลองของสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ภายใต้การกำกับของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (หมายเลข Re. 002/10)

ภาพ 12 ลักษณะกรงเลี้ยงของหนูทดลอง

3. การป้อนสารให้กับหนูทดลอง

การป้อนสารสกัด ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 15 ที่ตัดปลายส่วนที่แหลมออก ลบคมให้ทู่และทำให้โค้ง เพื่อความสะดวกในการป้อนและการต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตรขณะทำการป้อนใช้กระบอกฉีดยาดูดสารปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้นิ้วโป้งและนิ้วมือซ้ายจับรวบบริเวณต้นคอหนู เพื่อบังคับให้ปากมีช่องว่าง สำหรับป้อนสารที่ใช้ในการทดลองเข้าไป ส่วนนิ้วที่เหลือใช้บังคับและพยุงหนูให้นิ่ง โดยสุดท้ายหนูจะอยู่ในลักษณะอ้าปากเล็กน้อย จากนั้นค่อยๆ สอดเข็มเข้าไปมุมปากทางด้านซ้ายให้ถึงหลอดอาหารลึกพอประมาณแล้วจึงป้อนสารเข้าไปอย่างรวดเร็ว ในการป้อนนี้ควรระวังอย่าให้เข็มสอดผิดเข้าในบริเวณหลอดลม ซึ่งอาจทำให้หนูสำลักได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำวิจัยจะป้อนสารสกัดแก่หนูทดลองเป็นเวลา 60 วัน โดยแบ่งหนูออกเป็น 9 กลุ่มๆ ละ 8 ตัวดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนน้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารสกัดจากใบมะรุมขนาด 60 mg/kgBW

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดจากใบมะรุมขนาด 120 mg/kgBW

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดจากใบมะรุมขนาด 180 mg/kgBW

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสกัดจากใบมะรุมขนาด 240 mg/kgBW

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารสกัดจากใบว่านพญาวานรขนาด 5 mg/kgBW

กลุ่มที่ 7 ป้อนสารสกัดจากใบว่านพญาวานรขนาด 10 mg/kgBW

กลุ่มที่ 8 ป้อนสารสกัดจากใบว่านพญาวานรขนาด 15 mg/kgBW

กลุ่มที่ 9 ป้อนสารสกัดจากใบว่านพญาวานรขนาด 20 mg/kgBW

ตลอดระยะเวลาการทดลองจะชั่งน้ำหนักหนูสัปดาห์ละครั้ง เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมและว่านพญาวานรตามขนาดที่ต้องการ

4. การตรวจสอบพิษก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีไมโครนิวเคลียส

เมื่อเลี้ยงหนูครบ 60 วัน นำหนูมาสลบ โดยใช้ Chloroform ตัด Femur ของขาขวามาล้างไขกระดูกด้วย Fetal bovine serum ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีนำตะกอนที่ได้มา smear บนสไลด์ รอให้แห้ง นำสไลด์ที่แห้งดีแล้วมาคงสภาพด้วย absolute alcohol ย้อมด้วยสี Methylene blue เป็นเวลา 5 นาที และย้อมซ้ำด้วยสี Eosin 0.5% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Schmid, 1985) โดยปกติจะรายงานผลในรูปของร้อยละของจำนวนไมโครนิวเคลียส (MNPCE/PCE(%)) และอัตราส่วนของ Polychromatic erythrocyte กับ Normochromatic erythrocyte (PCE/NCE ratio)

การนับจำนวนการเกิดไมโครนิวเคลียสนั้น จะนับจากเซลล์ตัวอ่อนเม็ดเลือดแดงของหนูทดลองตัวละ 3 ครั้ง ครั้งละ 3,000 เซลล์ กลุ่มละ 5 ตัว (Total = 45,000) ส่วนการหาค่า PCE/NCE ratio นั้นจะทำการนับจากเซลล์ตัวอ่อนเม็ดเลือดแดงของหนูทดลองตัวละ 3 ครั้ง ครั้งละ 400 เซลล์ กลุ่มละ 5 ตัว (Total = 6,000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การตรวจสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

เมื่อเลี้ยงหนูทดลองครบ 60 วัน นำหนูมาสลบโดยใช้ Chloroform ทำการผ่าตัดเปิดช่องอกเพื่อเก็บเลือดด้วยวิธี Cardiac puncture ดูดเลือดออกมา 5 มิลลิลิตร จากนั้นตัดเก็บส่วนของตับและไต ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ลงในสารละลาย Bouin's fixative เพื่อทำการศึกษาเนื้อเยื่อต่อไป เลือดที่เก็บได้แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มี Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) เพื่อใช้ศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา ส่วนที่เหลือ 4 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่มีความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนของซีรั่มไปตรวจสอบค่าทางชีวเคมีต่อไป

ซีรั่มที่แยกได้จากเลือดจะถูกบรรจุใน eppendrof เพื่อนำส่ง หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ศูนย์บริการสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อตรวจหาค่าทางชีวเคมีที่บ่งชี้การทำงานของตับและไต

5.1. การตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา

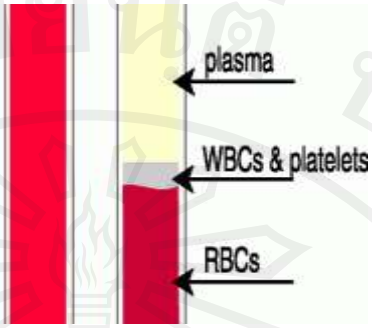
5.1.1 การวัดความเข้มข้นฮีโมโกลบิน

ใส่สารละลาย Drabkin's solution 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ใส่ตัวอย่างเลือด 20 ไมโครลิตร ผสมลงในสารละลายที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำสารที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปหาปริมาณฮีโมโกลบิน โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) (แสดงในภาคผนวก ข)

5.1.2 การวัดปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

ดูดเลือดสู่หลอด Heparinized capillary tube ที่มีความยาว 75 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ดูดเลือดให้ได้ 4 ใน 5 ส่วนของความยาวหลอด จากนั้นปิดปลายด้านหนึ่งไว้ด้วยดินน้ำมัน นำหลอด Capillary ที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่อง Hematocrit centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงบนจานอ่านค่า ค่าที่อ่านได้จะอยู่ในรูปเปอร์เซ็นต์ การอ่านค่าให้พิจารณาเฉพาะชั้นเซลล์สีแดงเท่านั้น (ไม่นับส่วนสีขาวเทาซึ่งเป็นส่วนของเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือด และชั้นบนสุดซึ่งเป็นสีใสซึ่งเป็นชั้นพลาสมา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 13 การแยกชั้นของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

ที่มา: ศักดา (2551)

5.1.3 การนับจำนวนรวมของเม็ดเลือดแดง

ผสมเลือด 10 ไมโครลิตร กับสารละลาย Grower's solution ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากันอย่างน้อย 3 นาที จากนั้นจึงหยดลงใน Haematocytometer chamber นำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 40x นับจำนวนเม็ดเลือดแดงจำนวน 5 ช่องเล็กต่อข้าง จึงนำค่าที่นับได้ไปคำนวณหาค่าเม็ดเลือดแดงโดยรวม (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข)

5.1.4 การนับจำนวนรวมเม็ดเลือดขาว

ผสมเลือด 10 ไมโครลิตรกับสารละลาย Turk's solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากันอย่างน้อย 3 นาที จากนั้นจึงหยดส่วนผสมลงใน Haemacytometer chamber ทิ้งไว้นาน 1 นาที จากนั้นนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 40x นับจำนวนเม็ดเลือดขาวจำนวน 4 ช่องใหญ่ต่อข้าง จึงนำค่าที่นับได้ไปคำนวณหาค่าเม็ดเลือดขาวโดยรวม (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข)

5.1.5 การนับเม็ดเลือดขาวแยกชนิด

นำเลือดมาทำ Blood smear บนสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นย้อมด้วยชุดย้อมสี Wright Giemsa stain เมื่อสไลด์แห้งดีแล้วจึงนำมาศึกษาจำนวนเม็ดเลือดขาวแยกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 40x นับจำนวนเม็ดเลือดขาวจำนวน 100 เซลล์ต่อ 1 สไลด์ของ Blood smear ทำให้ครบ 3 สไลด์ต่อหนู 1 ตัว จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย (รายละเอียดการทำ Blood smear และการย้อมสีแสดงในภาคผนวก ค)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การตรวจสอบผลทางเนื้อเยื่อ

นำเนื้อเยื่อตับและไตมาตรึงสภาพในสารสะลาย Bouin's fixative จากนั้นนำไป dehydrate ด้วย grading ethanol ทำการ clearing ด้วย xylene แล้วนำไปผ่านขบวนการ infiltration ด้วย paraffin นำมาทำ paraffin section โดยตัดที่ความหนา 6 ไมโครเมตร และย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ Eosin จากนั้นตรวจสอบความผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมกับบันทึกภาพความผิดปกติที่สามารถสังเกตพบของเนื้อเยื่อ (รายละเอียดการเตรียมสไลด์ แสดงในภาคผนวก ค)

6. การทดสอบทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาทดสอบความแปรปรวน(Analysis of variance) โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 16 และแสดงผลออกมาในรูปของ Mean ± Standard deviation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved