บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และ สารทดลอง

1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 280 - 320 กรัม และหนูถีบจักร เพศผู้ น้ำหนัก 23 - 26 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

1.2 เครื่องมือ

Organ bath ใช้แบบ double walled Churchill type ซึ่งประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในมีความจุ 25 มิลลิลิตร เป็นชั้นที่บรรจุสารละลายที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (physiological solution) ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำให้ไหลเข้าออกในชั้นนี้ organ bath จะมีช่องเป็นทางเปิดให้อากาศ (ประกอบด้วยก๊าซออกซิเจน 95% กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%) ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นใน (รูปที่ 3)

Microsyringe ขนาด 10, 25, 50 ไมโครลิตร

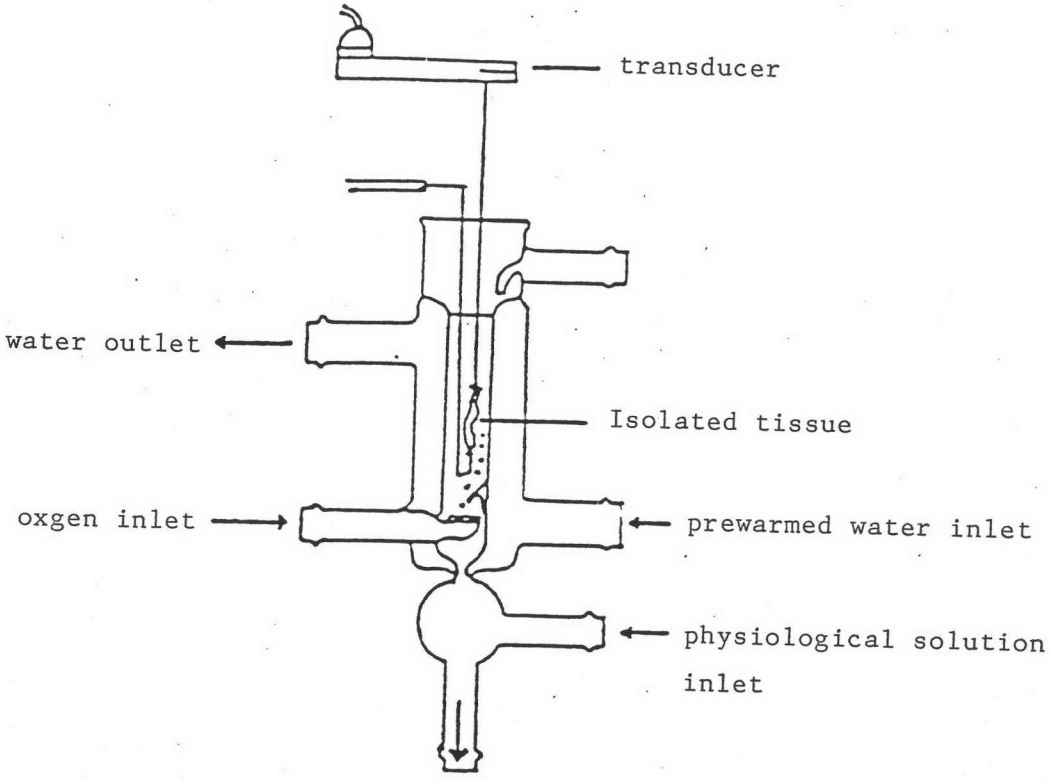
Isometric transducer (Statham UC 3)

Dynograph type R (Beckman)

Pressure transducer (Bell & Howell)

1.3 สารทดลอง

แอนซิสโตรเทคโตรีน สารสกัดบริสุทธิ์จากนิจศิริ เรืองรังษี (Ruangrungsi *et.al.*, 1985) ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เตรียมให้อยู่



รูปที่ 3 Organ Bath

ในรูปสารละลายของเกลือไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร pH 5.5 - 6.0

Acetylcholine chloride (Sigma); Atropine sulphate (องค์การ-เภสัชกรรม); Barium chloride (Sigma); Calcium chloride (Merck); Carbachol (Sigma); α-D (+) glucose (Sigma); Magnesium chloride (May & Baker); Potassium chloride (Merck); Sodium chloride (Merck); $NaHPO_4.H_2O$ (Baker); $NaHCO_3$ (Merck); 5-Hydroxytryptamine (5-HT) หรือ Serotonin (Sigma); Verapamil (Ludwigshafen); Papaverine hydrochloride (Sigma)

2. วิธีทำการทดลอง

2.1 ศึกษาฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรีนต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวที่แยกออกมาจากสัตว์ทดลองโดยตัดชิ้นเนื้อให้อยู่ในรูปของ fundus strip

วิธีตัดกระเพาะอาหารหนูขาวให้อยู่ในรูปของ fundus strip (Vane, 1957) โดยนำหนูขาวทำให้หมดความรู้สึกด้วยท่อนเหล็กตีที่บริเวณรอยต่อหัวและก้านคอ ผ่าตัดเปิดหน้าท้องตัดเอาส่วนที่เป็นกระเพาะนำมาใส่ใน petri dish ซึ่งบรรจุสารละลายไทโรด (Tyrode) (ส่วนประกอบสารละลายไทโรดดังแสดงในตารางที่ 1) และมีก๊าซออกซิเจน 95% + ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดกับกระเพาะทิ้งไป ลักษณะกระเพาะอาหารหนูขาวมีลักษณะคล้ายบัลลูน แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนฟันดัส (Fundus) เป็นส่วนบางสีขาวปนแดงอ่อน ๆ สามารถมองทะลุผ่านเห็นอาหารเหลว (contents) ในกระเพาะได้ และมีปริมาตรเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้มากขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารในกระเพาะ อีกส่วนคือไพลอริคแอนทรัม (Pyloric antrum) เป็นส่วนที่หนาและแดงจัด มองไม่ทะลุผ่านเห็นอาหารเหลวในกระเพาะ ทั้ง 2 ส่วนนี้มองเห็นแตกต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนฟันดัสจะทำหน้าที่ในการหดตัวเพื่อให้อาหารเหลวเคลื่อนมาที่แอนทรัม ดังนั้นจึงตัดเอาเฉพาะส่วนฟันดัส (รูปที่ 4 ก) ออกมาล้างด้วยไทโรดให้อาหารเหลวออกให้หมด แล้วเปิดฟันดัสโดยตัดส่วนที่เป็น lesser curvature (รูปที่ 4 ข) เพื่อเก็บกล้ามเนื้อส่วนที่เป็น longitudinal ไว้ใช้ เพราะส่วนนี้ให้ความไวต่อการกระตุ้น 40 - 80 เท่า ขณะที่

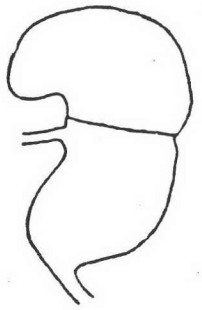
ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ physiological solution

	Tyrode's solution g/litre	potassium-depolarizing Tyrode's solution g/litre
NaCl	8.00	1.58
KCl	0.20	7.46
$MgCl_2.6H_2O$	0.21	0.25
$CaCl_2.2H_2O$	0.26	-
NaH_2PO_4	0.05	-
$NaHCO_3$	1.00	1.26
glucose	1.00	1.98
aerating gas 95% O_2 + 5% CO_2		

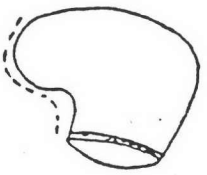
กล้ามเนื้อส่วน circular ให้ความไวต่อการกระตุ้น 6 - 18 เท่า เปิดฟันดัสและตัดตามเส้นประซึ่งห่างกันประมาณ 1.5 มิลลิเมตร (รูปที่ 4 ค) และตัดเป็นชิ้นยาวชิ้นละ 2 เซนติเมตร (รูปที่ 4 ง) ปลายหนึ่งของเนื้อเยื่อเกี่ยวอยู่กับขอเหล็กขนาดเล็กอยู่ใน organ bath ซึ่งบรรจุสารละลายไทโรด 25 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีก๊าซออกซิเจน 95% กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลา อีกปลายหนึ่งของเนื้อเยื่อผูกติดกับด้าย และปลายด้ายอีกข้างหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งต่อเข้ากับ Dynograph กระเพาะจะถูกดึงให้ตึงภายใต้แรงดึง 1 กรัม (รูปที่ 3) ต้อง incubate นานประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนการทดลอง ในช่วงนี้ต้องคอยเปลี่ยนไทโรดใน organ bath อย่างน้อยทุก 15 นาทีต้องเปลี่ยน 1 ครั้ง แล้วจึงเริ่มทำการทดลอง โดยบันทึกการหดตัวที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction) จนคงที่ (stable) จึงเริ่มให้ยา

ก. ศึกษาฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรีนต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวที่แยกจากสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วย agonist ต่าง ๆ ได้แก่ อะเซททีลโคลีน ซีโรโตนิน (5-HT) แบเรียมคลอไรด์ โปแตสเซียมคลอไรด์ รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรีนกับ antagonist ของสารกระตุ้นดังกล่าวได้แก่ อะโทรปีน เวอราปามิล เมททีลเซอไจด์ และปาปาเวอรีน

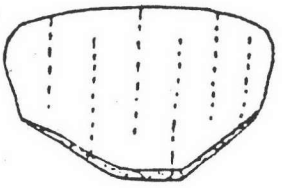
ทำ cumulative dose-response curve ของ agonist ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคของ Van Rossum (Van Rossum, 1963) แล้วล้าง Fundus strip ด้วยสารละลายไทโรดหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้สาร agonist ออกหมด incubate กล้ามเนื้อ Fundus strip ไว้จนกล้ามเนื้อกระเพาะคลายตัวสู่สภาพเดิมก่อนกระตุ้นด้วยสารต่าง ๆ โดยสังเกตจากปลายปากกาของ recorder จะกลับสู่ baseline จากนั้นให้สารละลายแอนซิสโตรเทคโตรีนให้สัมผัสกับ Fundus strip นาน 5 นาทีไม่ต้องล้างออก ทำ cumulative dose-response curve ของ agonist อีกครั้ง เสร็จแล้วนำ Fundus strip ทิ้งไป เตรียม Fundus strip ขึ้นใหม่เมื่อทำการทดลองซ้ำ การประเมินผลการทดลองโดยวัดขนาดของการหดตัวของกระเพาะเป็นมิลลิเมตร แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ของการหดเกร็งสูงสุด (Maximum contraction) ของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหาร (ได้จากการทำ cumulative dose-response curve ครั้งแรก) ความเข้มข้นของแอนซิสโตรเทคโตรีนที่ใช้ทดสอบกับอะเซททีลโคลีนและโปแตสเซียมคลอไรด์ เท่ากับ 1×10^{-5} และ 3×10^{-5} โมล



4 ก



4 ข



4 ค

4 ง

รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการตัดกระเพาะอาหารหนูขาวให้อยู่ในรูป fundus strip

4 ก กระเพาะอาหารหนูขาวทั้งกระเพาะ ส่วนบนเป็นส่วนฟันดัส

4 ข เปิดฟันดัสโดยตัดส่วนที่เป็น lesser curvature (เส้นประ)

4 ค เมื่อตัดตามเส้นประ ดังรูป

4 ง fundus strip

ที่ใช้ทดสอบกับซีโรโตนินและแบเรียมคลอไรด์ เท่ากับ 1×10^{-5} และ 2×10^{-5} โมล สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบผล antagonist ต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของอะโทรปีน 8.5×10^{-9} และ 1.7×10^{-8} โมล ความเข้มข้นของเวอราปามิล 1.3×10^{-7}, 2.6×10^{-7} โมล ความเข้มข้นของปาปาเวอรีน 1.3×10^{-5}, 2.5×10^{-5} โมล ความเข้มข้นของเมททีลเซอไจด์ 1×10^{-8} โมล โดยทำการทดลองใช้ cumulative dose-response curve เช่นเดียวกัน

ข. ศึกษาฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรีนต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ-กระเพาะอาหารหนูขาวที่แยกจากสัตว์ทดลองที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายดีโปลาไรด์ด้วยโปแตสเซียมที่ปราศจากแคลเซียม (High-potassium calcium-free depolarizing solution)

หลังจาก incubate กระเพาะ (Fundus strip) ด้วยไทโรดนาน 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นสารละลายดีโปลาไรด์ด้วยโปแตสเซียมที่ปราศจากแคลเซียม (ตารางที่ 1)(Van Den Broucke & Lemli, 1982) เพื่อที่จะกำจัดแคลเซียมทั้งภายในและภายนอกเซลล์โดยหมั่นเปลี่ยนสารละลายทุก 5 นาที นาน 1 ชั่วโมง กระเพาะจะค่อย ๆ คลายตัวกลับสู่สภาพเดิม โดยสังเกตที่กระดาษบันทึกปลายปากกาจะกลับสู่ base line (ในตอนแรก ๆ ที่เปลี่ยนสารละลายใหม่ ๆ กระเพาะจะหดเกร็งมาก) หลังจากนั้นทำcumulative dose-response curve ของแคลเซียมคลอไรด์ใช้เทคนิคของ Van Rossum ที่กล่าวมาแล้ว ขนาดความเข้มข้นของแอนซิสโตรเทคโตรีนที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 2.4×10^{-6} และ 1×10^{-5} โมล เมื่อเปรียบเทียบผลแอนซิสโตรเทคโตรีนกับเวอราปามิลขนาดความเข้มข้นเท่ากับ 1.8×10^{-8} และ 3.5×10^{-8} โมล

2.2 ศึกษาฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรีนต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะในหนูถีบจักรที่แยกจากสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยแบเรียมคลอไรด์และคาร์บาคอล (carbachol)

นำหนูถีบจักรมาทำให้สลบ ผ่าตัดเอากระเพาะทั้งอันมาไว้ใน petri dish (เหมือนข้อ 2.1) ล้างเศษอาหาร (content) ในกระเพาะออกให้หมดด้วยสารละลายไทโรดที่มีออกซิเจน 95% กับคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกไขมันและเนื้อเยื่อ

เกี่ยวพันที่ติดกับกระเพาะทิ้งไป นำสาย polyethylene ที่ต่ออยู่กับ syringe ที่บรรจุสารละลายไทโรด โดยสอดสาย polyethylene อีกปลายที่เหลือลงไปในกระเพาะตรงไพโลริค แล้วเอาด้ายมัดปลายให้แน่น ในสาย polyethylene และในกระเพาะบรรจุสารละลายไทโรดให้เต็ม ไม่ให้มีอากาศเหลืออยู่โดยใช้ด้ายผูกมัดปลายกระเพาะตรงที่ต่อกับหลอดอาหารให้แน่น ป้องกันไม่ให้สารละลายไทโรดไหลออกมา นำสาย polyethylene ที่ต่อกับ syringe ถอดออกแล้วนำสาย polyethylene ไปต่อกับ pressure transducer และต่อกับ recorder incubate กระเพาะไว้ 1 ชั่วโมงจึงเริ่มให้ยา

ให้ยาครั้งเดียว (single dose) การทดลองใช้แอนซิสโตรเทคโตรีน ความเข้มข้น 6×10^{-5} โมล กระตุ้นกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารด้วยแบเรียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมล และ คาร์บาคอล 1×10^{-7} โมล โดยใช้กระเพาะอาหารคนละอันกัน

2.3 ศึกษาฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรีนต่อการบีบตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้ในหนูถีบจักรโดยวัดการเคลื่อนที่ไปของผงถ่านจากกระเพาะอาหารสู่ลำไส้เล็ก

ทำการทดลองในหนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 23 - 26 กรัม อดอาหารก่อนทดลองประมาณ 14 - 16 ชั่วโมง แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 - 15 ตัว ทำการทดลองตามวิธีของ Macht และ Barba-Gose (Macht & Barba-Gose, 1931) Charcoal meal ที่ใช้เป็นตัวชี้บอกถึงความมากน้อยของการเคลื่อนไหวของกระเพาะและลำไส้นั้น มีส่วนประกอบดังนี้คือ tragacanth 2 กรัม เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย บดให้เข้ากันแล้วเติมผงถ่าน 12 กรัม บดให้เป็น suspension แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 130 มิลลิลิตร

การทดลองได้แบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 4 กลุ่ม ขั้นตอนแสดงการให้ยาในรูปที่ 5

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ให้น้ำเกลือ 0.2 มิลลิลิตร ทางหลอดเลือดดำ หลังจากนั้น 15 นาทีให้ charcoal meal 0.2 มิลลิลิตรทางปาก โดยใส่เข็มให้ยาทางปากเข้ากระเพาะหนู ปลายเข็มต่อกับ tuberculin syringe ซึ่งบรรจุ charcoal meal ไว้ แล้วดัน charcoal meal เข้ากระเพาะช้า ๆ หลังจากนั้น 20 นาที ทำให้หนูสลบโดยดึงข้อต่อบริเวณลำคอ จากนั้นเปิดหน้าท้องตัดแยกกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กออกมา วัดระยะทางที่ charcoalเคลื่อนไปตามลำไส้เล็ก (เริ่มวัดจาก gastroduodenal junction ถึง ileocaecal junction)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง ให้ยาแอนซิสโตรเทคโตรีน (50 มก./กก.) 0.2 มิลลิลิตร ทางหลอดเลือดดำ หลังจากนั้น 15 นาทีให้ charcoal meal 0.2 มิลลิลิตร ทางปากเป็นเวลานาน 20 นาที ทำหนูให้สลบ ขั้นตอนต่อไปเหมือนกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 3 ให้ยากระตุ้นการหดเกร็งของกระเพาะอาหาร ได้แก่ คาร์บาคอล (1.5 มก./กก.) 0.2 ซีซี. ทางหน้าท้อง (intraperitoneum) เป็นเวลานาน 20 นาที จึงให้ charcoal meal0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 20 นาที ทำหนูให้สลบ ขั้นตอนต่อไปเหมือนกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 4 ให้คาร์บาคอล (1.5 มก./กก.) 0.2 มิลลิลิตรทางหน้าท้อง เป็นเวลานาน 5 นาที จึงให้แอนซิสโตรเทคโตรีน (50 มก./กก.) 0.2 มิลลิลิตรเป็นเวลานาน 15 นาที จึงให้ charcoal meal 0.2 มิลลิลิตรทางปาก หลังจากนั้น 20 นาทีทำหนูให้สลบ ขั้นตอนต่อไปเหมือนกลุ่มที่ 1

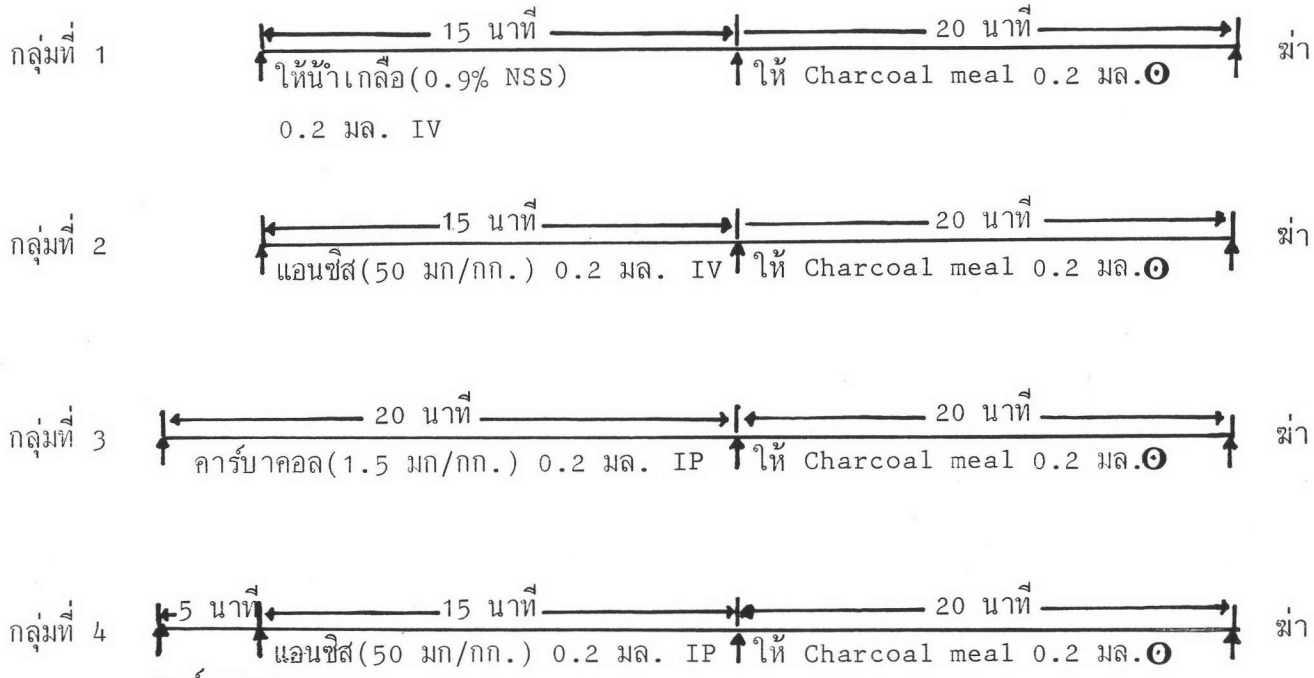
3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจะแสดงผลในรูป mean และ Standard error of mean (SE.) ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ "Student's t test" เมื่อ P-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยนัยสำคัญทางสถิติ

การคำนวณ drug parameter ของ Van Rossum (Van Rossum, 1963) ค่า logarithm ของ affinity ของ Competitive antagonist แสดงในรูป PA_2 Values ซึ่งก็คือค่าของ negative logarithm ของความเข้มข้นของ competitive antagonist ในหน่วยโมล (Molar) ที่ทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของ agonist สองเท่าจึงจะได้การตอบสนองเท่าเดิม PA_2 Values คำนวณได้จากสมการ

$$PA_2 = -\log(B) + \log\left(\frac{A_B}{A_o} - 1\right)$$

013863



หมายเหตุ IV = Intravenous

IP = Intraperitoneum

แอนซิส = แอนซิสโตรเทคโตรีน

⊙ = ให้ทางปาก

รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการให้ยาในการศึกษาฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรีนต่อการบีบตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้ในหนูถีบจักร

B คือความเข้มข้นของ Competitive antagonist ในหน่วยโมล

A_B, A_o คือความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมล ที่ทำให้เกิด 50% response เมื่อมี antagonist และไม่มี antagonist ตามลำดับ

logarithm ของ affinity ของ noncompetitive antagonist แสดงในรูป PD_2' Values ซึ่งก็คือค่าของ negative logarithm ของความเข้มข้นของ noncompetitive antagonist ในหน่วยโมลซึ่งทำให้ maximum response ที่เกิดจาก agonist ลดลง 50% PD_2' Value คำนวณจากสมการ

$$PD_2' = - \log [B'] + \log \left(\frac{E_{Am}}{E_{AmB'}} - 1 \right)$$

B' คือความเข้มข้นของ noncompetitive antagonist ในหน่วยโมล

E_{Am}, $E_{AmB'}$ คือ maximum contraction ที่เกิดจาก agonist เมื่อไม่มี antagonist และมี antagonist ตามลำดับ