หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ สารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

ใช้สัตว์ทดลอง 3 ชนิด

กระต่ายไม่จำกัดเพศ น้ำหนักประมาณ 1 - 1.5 กิโลกรัม จากฟาร์มผู้เลี้ยง

หนูตะเภาไม่จำกัดเพศ น้ำหนักประมาณ 350 - 500 กรัม จากฟาร์มผู้เลี้ยง

หนูถีบจักร เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 20 - 22 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

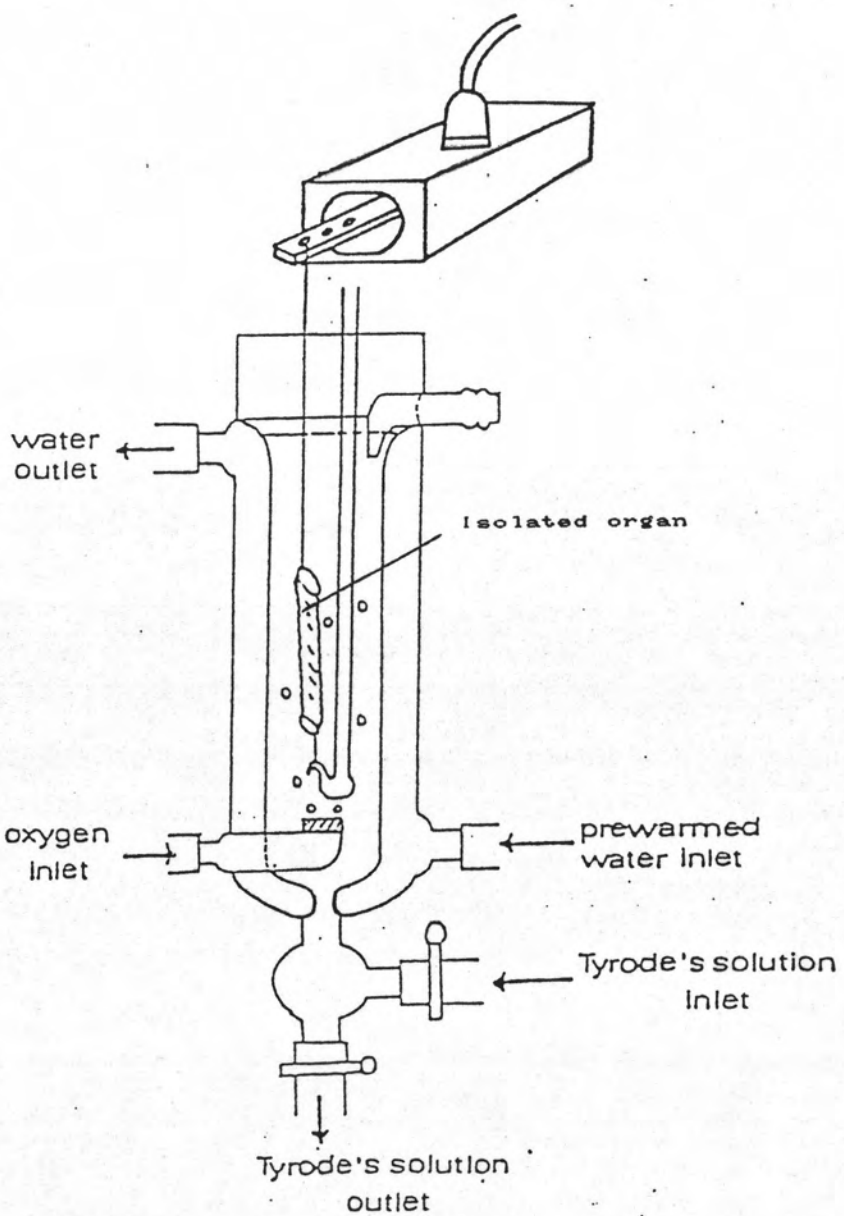
2. เครื่องมือ

2.1 ใช้ organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) ซึ่งมีความจุประมาณ 25 มิลลิลิตร ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยจะมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำคอยควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ซึ่งจะส่งน้ำให้ไหลเข้าออกในชั้นนอกอย่างสม่ำเสมอ และorgan bath ยังมีช่องทางเปิดให้อากาศ ซึ่งประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และก๊าซออกซิเจน 95% ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นในได้ (ดูรูปภาพที่ 5)

2.2 ชุด Isolated organ bath ของบริษัท C. P. Palmer, thermoregulating water pump Churchill type และที่ทำเองในประเทศไทย ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ $\pm$ 0.5 °ซ

รูปภาพที่ 5

แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลอง ลำไส้เล็กที่แยกจากตัวสัตว์ทดลอง



2.3 เครื่องมือวัดแรงหดตัว Isotonic Transducer และ Pressure Transducer ของ Washington Transducer

2.4 เครื่องบันทึกผลการทดลอง Polygraph Recorder ของบริษัท Washington 400 M. D. 2c

2.5 เครื่องขยายผลการทดลอง Gilson Recorder N. 2

3. สารเคมี

3.1 อัลคาลอยด์หลักจากเปลือกและใบ ต้นตาเสือทุ่ง (Dysoxylum cyrtobotryum Miq.) สกัดและทดสอบทางเคมีโดยรองศาสตราจารย์ ดร. เอกรินทร์ สายฟ้า ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระตุ้นให้กล้ามเนื้อกระเพาะและลำไส้หดเกร็งได้แก่

- Acetylcholine chloride (Sigma)
- Histamine dihydrochloride (Sigma)
- 5- Hydroxytriptamine creatinine sulfate complex (Sigma)
- Barium chloride (May & Baker)
- Calcium chloride (Merck)

3.3 สารเคมีที่ใช้เป็นสารยับยั้งมาตรฐาน (โดยยับยั้งฤทธิ์ของสารกระตุ้นในข้อ 3.2) เปรียบเทียบกับสารอัลคาลอยด์สกัดจากตาเสือทุ่ง ได้แก่

- Atropine sulfate (Sigma)
- Papaverine hydrochloride (Sigma)
- Verapamil hydrochloride (Knoll)

3.4 สารเคมีที่ใช้เตรียม physiological solution ใช้ analytical grade มีดังนี้ NaCl (M.W. 58.44, Sigma), $NaHCO_3$ (M.W.84.01, Merck), KCl (M.W.74.56, Sigma), $CaCl_2.2H_2O$ (M.W. 147.02, Merck), $MgCl_2.6H_2O$(M.W. 203.00,May & Baker), $MgSO_4.7H_2O$(M.W.246.5,May & Baker) NaH_2PO_4 (M.W. 119.98, Sigma), D(+)-Glucose (M.W.147.02,Sigma)

ตารางที่ 2

แสดงส่วนประกอบของเกลือชนิดต่าง ๆ ใน physiological solution (กรัม/ลิตร)

PHYSIOLOGICAL SOLUTION

	TYRODE'S SOLUTION	POTASSIUM-DEPOLARIZING TYRODE'S SOLUTION
NaCl	8.0	1.58
KCl	0.2	7.46
$CaCl_2$	0.2	--
$MgCl_2$	0.1	0.11
$NaHCO_3$	1.0	1.26
NaH_2PO_4	0.05	--
Glucose	1.0	1.98

Gas 95% O_2 plus 5% CO_2

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองจะรายงานในรูป ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน(mean ± standard error of the means)

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมใช้ Student's paired t - test ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล 2 ชุดใช้ Student's unpaired t - test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<.05$) และ 99% ($p< .01$)

การคำนวณค่า drug parameter

ทำโดยใช้วิธีของ Van Rossum ,Hurkmans และ Wolters (1963)ดังนี้

1. ค่า Logarithm ของ affinity ของ Competitive antagonist

แสดงในรูป pA_2 ซึ่งคือค่า negative logarithm ของความเข้มข้นของตัวกระตุ้นชนิดแย่งจับที่ตัวรับสัมผัสเดียวกัน (competitive antagonist) ในหน่วยโมลาร์ที่ทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของตัวกระตุ้น (agonist) เป็นสองเท่า จึงจะได้การตอบสนองเท่าเดิม

pA_2 คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$pA_2 = -\log [B] + \log ([A_B]/[A_o] - 1)$$

[B] คือ ความเข้มข้นของ Competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์ (Molar)

$[A_B]$ คือ ความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิดการกระตุ้น 50 เปอร์เซนต์ เมื่อมี antagonist(B)อยู่ด้วย

$[A_o]$ คือ ความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิดการกระตุ้น 50 เปอร์เซนต์ เมื่อไม่มี antagonist อยู่

2. <u>ค่า Logarithm ของ affinity ของ Non-competitive antagonist</u>

แสดงในรูป pD_2' ซึ่งคือค่าของ negative logarithm ของความเข้มข้นของสารยับยั้งตัวกระตุ้นชนิดไม่แย่งจับที่ตัวสัมผัสรับเดียวกัน (Non - competitive antagonist) ในหน่วยโมลาร์ ซึ่งทำให้การตอบสนองสูงสุด (maximum response) ที่เกิดจากตัวกระตุ้น (agonist) ลดลง 50 เปอร์เซนต์

pD_2' คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$pD_2' = -\log [B'] + \log (E_{Am}/E_{AmB'} - 1)$$

$[B']$ คือ ความเข้มข้นของ Non - competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

E_{Am} คือ ค่าการหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้น เมื่อไม่มีสารยับยั้ง (Non - competitive antagonist)

$E_{AmB'}$ คือ ค่าการหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้นเมื่อมีสารยับยั้งอยู่ด้วย

วิธีการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการทดลองนอกตัวสัตว์ทดลอง (in vitro) โดยแยกเอาส่วนของกระเพาะอาหารและลำไส้ออกมาจากตัวสัตว์ แล้วจัดให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต (physiolgical solution) ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยสารละลายของ Tyrodeที่ใช้ในการทดลองนี้จะใช้ปริมาณที่สมมูลกันของ $MgSO_4$ แทน $MgCl_2$(Perry,1970) และเมื่อทำการทดลองที่ใช้ $BaCl_2$ เป็นสารกระตุ้นจะเปลี่ยนมาใช้ $MgCl_2$ ดังเดิมเช่นเดียวกับการทดลองของ Van Den Broucke และ Lemli (1980) สารละลายจะมีอุณหภูมิ 37 ° C และมีก๊าซผ่านตลอดเวลา ใส่สารละลายของอัลคาลอยด์ลงไปใน organ bathให้มีความเข้มข้น 4.9×10^{-5}โมลาร์ หรือ 1.6×10^{-4} โมลาร์ หรือ 4.9×10^{-4}โมลาร์ สำหรับวิธีศึกษาโดยละเอียดมีดังนี้

I. ศึกษาผลต่อการหดเกร็งของลำไส้ที่แยกออกมา

1. ลำไส้เล็กกระต่าย

1.1 ผลต่อลำไส้เล็กกระต่าย

ใช้กระต่ายเพศผู้ หรือเมีย น้ำหนักประมาณ 1 - 1.5 กิโลกรัม อดอาหารก่อนการทดลองเป็นเวลาประมาณ 14 - 16 ชั่วโมง โดยให้แต่น้ำ ทำให้ตายโดยการทุบบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและหัวจากนั้นก็ตัดคอ รีบผ่าบริเวณท้องเอาลำไส้เล็กส่วน jejunum นำมาใส่ใน beaker ที่มีสารละลาย Tyrode ซึ่งมีก๊าซ(95% O_2 + 5% CO_2) ผ่านตลอด ตัดไขมันและเนื้อเยื่อออก ใช้ syring ดูดสารละลาย Tyrode ล้างลำไส้ด้านใน แล้วนำไปตัดแบ่งเป็นท่อน ๆ ละประมาณ 1 - 2 ซม. จากนั้นผูกปลายทั้งสองให้แน่นด้วยด้ายโดยให้ปลายทั้งสองเปิด เพื่อให้สารละลาย Tyrode ผ่านได้ ผูกปลายด้านหนึ่งติดกับแท่งพลาสติคนำไปใส่ลงในกระเปาะแก้ว 2 ชั้น ซึ่งภายในบรรจุสารละลาย Tyrode 20 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำที่ไหลผ่านกระเปาะแก้วชั้นนอกตลอดเวลาจาก water bath ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 37 ° ซ และภายในกระเปาะแก้วชั้นนอกมีการไหลผ่านตลอด ปลายอีกด้านหนึ่งของลำไส้ไปผูกกับ isotonic transducer ซึ่งต่อกับเครื่อง recorder

ปรับให้ลำไส้มีความตึงตัว (Tension) 1 กรัมและ incubate ประมาณ30 - 45 นาที โดยล้างด้วย Tyrode หลาย ๆ ครั้งในระหว่างรอการทดลอง เมื่อลำไส้มีการหดตัวสม่ำเสมอแล้ว จึงให้สารละลายอัลคาลอยด์ในขนาดต่าง ๆ กัน โดยใช้ขนาด 4.9×10^{-5} โมลาร์ 1.6×10^{-4} โมลาร์ และ 4.9×10^{-4} โมลาร์

1.2 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารชนิดต่าง ๆ

เตรียมลำไส้เล็กของกระต่ายตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว หลังจากนั้นปล่อยให้ลำไส้หดตัวอยู่ในสารละลาย Tyrode ประมาณ 30 นาที จึงเริ่มการทดลองโดยการกระตุ้นด้วย Acetylcholine, Histamine, Barium chloride การทดสอบเพื่อต้องการศึกษาดูว่า อัลคาลอยด์นี้จะสามารถลดหรือยับยั้งฤทธิ์ของสารต่าง ๆ เหล่านี้ได้หรือไม่ การให้ยาจึงมีทั้งก่อนหรือหลังจากการให้สารกระตุ้นต่าง ๆ

2. ลำไส้เล็กของหนูตะเภา

ใช้หนูตะเภาเพศผู้ หรือเมีย น้ำหนักประมาณ 350 - 500 กรัม อดอาหารประมาณ 14 - 16 ชั่วโมงก่อนการทดลองให้แต่น้ำ เตรียมลำไส้หนูตะเภาเช่นเดียวกับที่ทดลองในกระต่าย โดยเปิดหน้าท้องเพื่อตัดเอาส่วน ileum โดยตัดให้ห่างจากileocaecal junction ประมาณ 10 เซ็นติเมตร นำส่วนที่ตัดได้มาใส่ใน petridish ที่มี Tyrode อยู่พร้อมด้วยก๊าซ (95% O_2 + 5% CO_2) ผ่านตลอด เวลาล้างลำไส้และผูกลำไส้เช่นเดียวกับที่ทำในลำไส้กระต่าย เนื่องจากลำไส้ของหนูตะเภาจะไม่มี spontaneous contraction จึงกระตุ้นด้วยสารชนิดต่าง ๆโดยการให้สารกระตุ้นในลักษณะ cumulative doses ตามวิธีของ Van Rossum และคณะ (1963)

2.1 ศึกษาฤทธิ์ของอัลคาลอยด์(R) ต่อการหดเกร็งของลำไส้ที่เกิดจาก Acetylcholine

ภายหลังจากเตรียมลำไส้เล็กของหนูตะเภาจนลำไส้อยู่ ในสภาพคงที่แล้ว จึงเริ่มทำ dose - response curve ของ Acetylcholine โดยใส่

Acetylcholine ลงไปในกระเปาะแก้วทุก ๆ 3 นาที บันทึกการตอบสนอง ให้ Acetylcholine จนกระทั่งเกิดการหดเกร็งสูงสุด ต่อจากนั้นล้างลำไส้หลาย ๆ ครั้ง ด้วยสารละลาย Tyrode ปล่อยให้ลำไส้แช่อยู่ในน้ำยาต่อไปประมาณ 30 - 45 นาที

ทดลอง dose - response curve ของ Acetylcholine เมื่อมีสารอัลคาลอยด์(R)อยู่ การทดลองจะทำจากลำไส้หนูตะเภาซึ่งได้ทำ dose - response ของ Acetylcholine และหลังการพักลำไส้แล้ว จึงให้สารละลายอัลคาลอยด์(R) 2 ขนาด คือ 1.6×10^{-4} โมลาร์ และ 4.9×10^{-4} โมลาร์ ดังนั้นในลำไส้หนูตะเภาแต่ละชิ้นจะถูกทดลอง 2 ครั้ง

รวบรวมการทดลองที่ได้มาคำนวณเขียนกราฟ dose - response โดยคิดเทียบการหดเกร็งสูงสุดในกลุ่มควบคุม ของ acetylcholine แต่ละคู่เท่ากับ 100%, คำนวณการตอบสนองเมื่อให้ Rohitukine ด้วย

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารกระตุ้นชนิดอื่น ๆ ได้แก่ histamine, 5-HT แล้ว นำมาเขียนกราฟเปรียบเทียบในแต่ละการทดลอง

ทำการศึกษาและคำนวณเปรียบเทียบเช่นเดียวกับข้างต้น แต่เปลี่ยนเป็นใช้ Papaverine ขนาด 1×10^{-6} โมลาร์ แทนอัลคาลอยด์(R)

II. <u>ศึกษาผลต่อการหดเกร็งของกระเพาะอาหาร</u>

1. <u>ศึกษาฤทธิ์ของ อัลคาลอยด์(R)ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะที่แยกออกมาจากหนูถีบจักร จากการกระตุ้นด้วย $BaCl_2$</u>

การทดลองนี้ใช้หนูถีบจักรขนาด 20 - 22 กรัม อดอาหารให้แต่น้ำก่อนการทดลอง 14 - 16 ชั่วโมง เตรียมแยกกระเพาะอาหารออกมาจากตัวหนู นำกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะมาล้างกากอาหารภายในให้หมดโดยการฉีดสารละลาย Tyrodeแล้วผูกปลายเปิดของหลอดอาหารให้ใกล้กับกระเพาะด้วยด้าย จากนั้นสอดสายโพลีเอธิลีน (Polyethylene) ที่มีสารละลาย Tyrode อยู่เติมเข้าไปในกระเพาะทางส่วนต่อกับลำไส้เล็ก ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของ สายPolyethylene ต่อกับ three - way stopcock ซึ่งต่อกับ pressure transducer สำหรับวัดแรงดันภายในกระเพาะ ของเหลวที่ใช้บรรจุใน pressure transducer เหมือนกับสารละลายที่บรรจุในกระเพาะอาหาร ฉีดสารละลาย Tyrode

ผ่านทาง Three - way เพื่อบรรจุสารละลายลงไปในกระเพาะ แล้วใช้มือไล่น้ำและฟองอากาศให้ผ่านออกมาทางส่วนต่อลำไส้เล็ก สัก 2 - 3 ครั้ง เมื่อแน่ใจว่าไม่มีฟองก๊าซอยู่ทั้งในสายโพลีเอธิลีน และกระเพาะ จึงรีบผูกปลายด้านลำไส้เล็กติดกับสายโพลีเอธิลีน จากนั้นปรับความดันภายในกระเพาะซึ่งนำมาแช่อยู่ในกระเปาะแก้ว 2 ชั้น เช่นเดียวกับที่ทดลองในลำไส้ ปรับความดันภายในกระเพาะประมาณ 25 - 30 มิลลิเมตรของน้ำ บันทึกผลของแรงดันลงบน Polygraph ปล่อยให้กระเพาะอาหารพักอยู่เช่นนี้ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนเริ่มทำการทดลอง ในการทดลองจะดูผลของอัลคาลอยด์(R)ต่อการหดตัวของกระเพาะอาหารที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย Barium cholride ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-4} โมลาร์(โดยใช้ความเข้มข้นของอัลคาลอยด์(R) 3 ขนาดคือ 4.9×10^{-5} โมลาร์, 1.6×10^{-4} โมลาร์, 4.9×10^{-4} โมลาร์) เทียบกับฤทธิ์ของ papaverine (3 ขนาด คือ 1×10^{-6} โมลาร์, 3×10^{-6} โมลาร์, 1×10^{-5} โมลาร์) บันทึกผลของความดันที่เปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2. <u>ศึกษาฤทธิ์ของ อัลคาลอยด์(R) ต่อการบีบตัวของกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรในภาวะที่ถูกดีโพลาไรซ์ จากการกระตุ้นด้วย Calcium chloride</u>

เตรียมกระเพาะของหนูถีบจักรเช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยขณะเตรียมหรือ ล้างกระเพาะใช้สารละลาย Tyrode เช่นเดิม แต่เมื่อเริ่มทดลองจะเปลี่ยนสารละลายในกระเพาะ pressure transducer และ organ bath มาใช้สารละลาย potassium - depolarizing Tyrode แทน หลังปรับความดันและ incubate แล้วทดลองดูผลของอัลคาลอยด์(R) ต่อการหดตัวของกระเพาะอาหารที่กระตุ้นด้วยสารละลายของ calcium chloride ความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของอัลคาลอยด์(R) ขนาด 1.6×10^{-4} โมลาร์

การเปรียบเทียบกับผลของเวอราปามิล (verapamil) โดยทำการทดลองเหมือนเดิม แต่ใช้เวอราปามิล ความเข้มข้น 1×10^{-5} โมลาร์ แทนอัลคาลอยด์(R)

บันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 15 นาที

3. ศึกษาฤทธิ์ของอัลคาลอยด์ (R.) ขนาด 4.9×10^{-5} โมลาร์ ต่อกราฟการตอบสนองกับขนาดสะสมของ $CaCl_2$ ในกระเพาะอาหารหนูถีบจักรทั้งกระเพาะที่อยู่ในภาวะดีโพลาไรซ์

เตรียมกระเพาะอาหารหนูถีบจักรให้อยู่ในภาวะดีโพลาไรซ์ พร้อมกับจัดเครื่องมือเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา ล้างกระเพาะอาหารด้วยสารละลายของ Tyrode ที่มีโปแตสเซียมปริมาณสูง แต่หลังจากปล่อยให้กระเพาะอาหารพักจนบันทึกได้ค่าปกติที่คงที่แล้วจึงกระตุ้นในลักษณะสะสมขนาดด้วย $CaCl_2$ ต่อ ๆ กันจนครบ 8 ความเข้มข้น โดยให้ความเข้มรวมภายใน organ bath มีค่า $1x10^{-5}$ โมลาร์ $3x10^{-5}$ โมลาร์ $1x10^{-4}$ โมลาร์ $3x10^{-4}$ โมลาร์ $1x10^{-3}$ โมลาร์ $3x10^{-3}$ โมลาร์ $1x10^{-2}$ โมลาร์และ $3x10^{-2}$ โมลาร์ตามลำดับ เทคนิคที่ใช้เช่นเดียวกับที่ศึกษาผลต่อกราฟการตอบสนองกับขนาดสะสมของสารกระตุ้นในลำไส้หนูตะเภา กระเพาะอาหารแต่ละชิ้นจะถูกทดลอง 3 ครั้ง โดยครั้งที่สองจะทำหลังจากล้างกระเพาะอาหารด้วยสารละลายที่ใช้ และปล่อยพักไว้จนได้ค่าบันทึกที่คงที่ปกติ ประมาณ 15 นาที จึงใส่สารละลายของอัลคาลอยด์ (R) ที่มีความเข้มข้น 4.9×10^{-5} โมลาร์ ลงไปก่อนเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงทำทดลองเช่นเดียวกับครั้งแรก และครั้งที่ 3 จะเป็นการบันทึกผลการทดลองกลุ่มควบคุมซ้ำอีกครั้ง