พระบรมราชูปถัมภ์ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และการทดลอง

1.1 สัตว์ทดลอง

กระต่าย เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 2,500 กรัม จากภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หนูขาว พันธุ์วิสตาร์ (wistar rat) เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ต.ศาลายา อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม

หนูตะเภา เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม จากฟาร์มผู้เลี้ยง

1.2 เครื่องมือ

Organ bath : การทดลองนี้ใช้แบบ Double walled Harvard Type ซึ่งประกอบด้วย หลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Physiological Solution) มีความจุ 25 มิลลิลิตร ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยจะมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำให้ไหลเข้าออกในชั้นนี้ Organ bath จะมีช่องเป็นทางเปิดให้อากาศ (ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% + ก๊าซออกซิเจน 95%) ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นใน (รูปที่ 3)

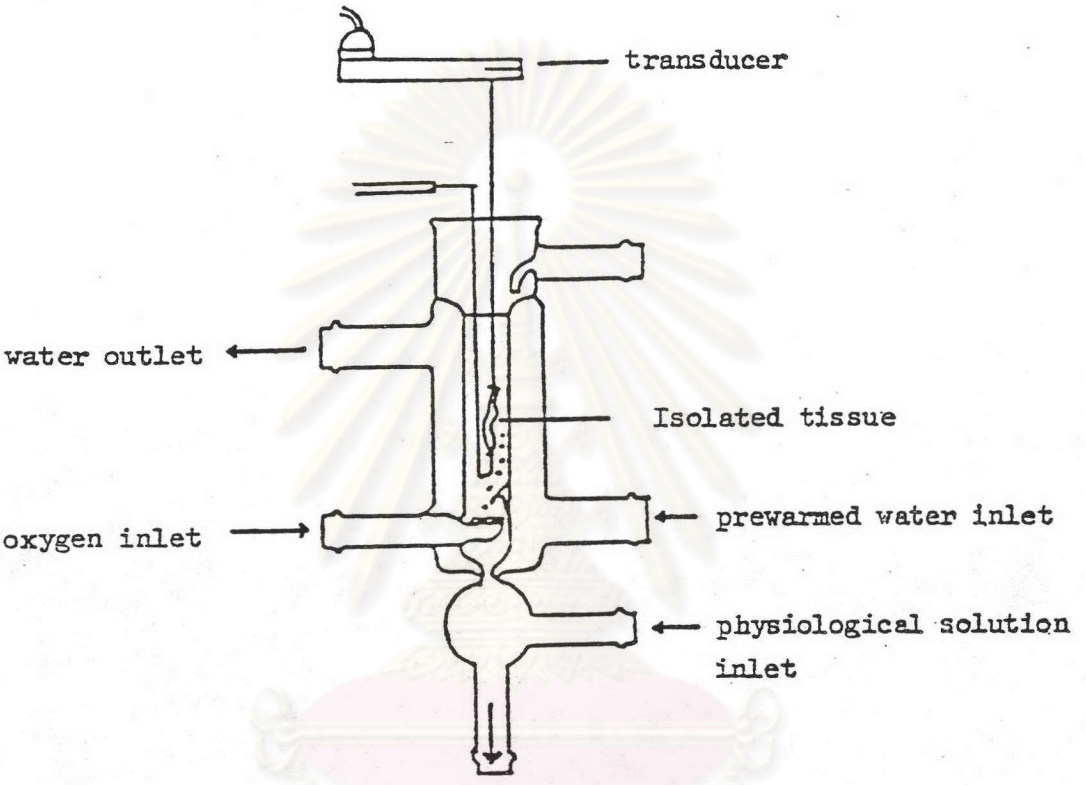
Oscillograph recorder Bioscience Model Harvard Apparatus

Isotonic transducer Bioscience Model Harvard Apparatus

Isometric (Force Displacement) transducer, Grass Apparatus

Electrical Stimulator Harvard Apparatus

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 Organ bath

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 สารทดลอง

14-ดีออกซี-11, 12-ไดดีไฮโดรแอนโดรกราโฟไลด์ สารสกัดบริสุทธิ์ ได้รับจากภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เตรียมให้อยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Acetylcholine chloride	Sigma
Carbamylcholine chloride	Sigma
$BaCl_2.2H_2O$	Merck
5-Hydroxytryptamine (Serotonin)	Sigma
Atropine sulfate	Sigma
Verapamil hydrochloride ภายใต้เครื่องหมายการค้า Isoptin	
Cyproheptadine hydrochloride	Sigma

1.4 การให้สารทดลอง

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองนอกตัวสัตว์ทดลอง

การทดลอง in vitro : หลังจากเนื้อเยื่อถูกปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วจะเริ่มให้สารทดลองลงใน organ bath โดยใช้ automatic micropipett

2. วิธีการ

2.1 ศึกษาผลของ AC_2 ต่อการหดตัวที่เกิดขึ้นเองของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวกระต่าย (Isolated rabbit jejunum)

เตรียมสัตว์ทดลองโดย อดอาหารกระต่ายนาน 15 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง โดยให้น้ำเพียงอย่างเดียว นำกระต่ายมาทำให้หมดความรู้สึก โดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างส่วนหัวและก้านคอ จากนั้นผ่าตัดเปิดหน้าท้อง โดยตัดแยกลำไส้เล็กส่วน jejunum นำมาแช่ในสารละลายไทโรด (Tyrode, ตารางที่ 1) ล้างลำไส้ให้สะอาดด้วยสารละลายไทโรด จากนั้นตัดลำไส้ให้ได้ความยาวชิ้นละ 1-2 เซนติเมตร ใส่ใน petri-dish ที่บรรจุสารละลายไทโรด และมีก๊าซออกซิเจน 95% , ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลา เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่าง ๆ ออกให้หมด ใช้ด้ายผูกปลายลำไส้ทั้ง 2 ข้าง ให้อยู่ในลักษณะ

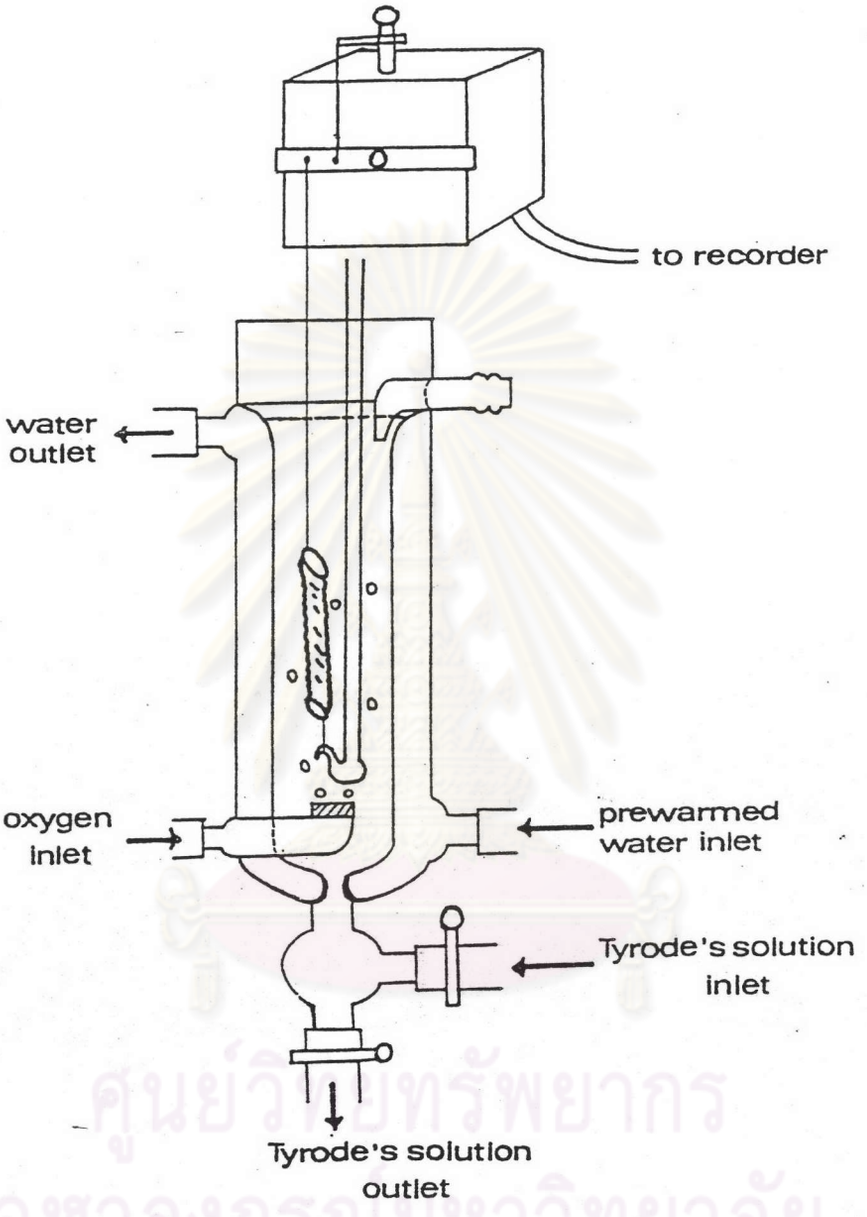
ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายไทโรด (Tyrode) ใน 1 ลิตร

สารเคมี	สารละลายไทโรด (กรัม/ลิตร)	สารละลายดีโปลาไรด์(กรัม/ลิตร)
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
	O_2 95% + CO_2 5%	

ปลายเปิด ปลายด้านหนึ่งผูกติดกับขอแก้ว จุ่มขอแก้วลงใน organ bath ซึ่งบรรจุสารละลายไทโรด ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส และให้ก๊าซออกซิเจน 95%, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลา ปลายอีกด้านหนึ่งของลำไส้ผูกติดกับ isotonic transducer ซึ่งต่อเข้ากับ oscillograph recorder (รูปที่ 4) ลำไส้จะถูกดึงให้ตึงภายใต้แรงดึง 1 กรัม เป็นเวลา 45 นาที ก่อนการทดลอง จากนั้นจึงเริ่มบันทึกการหดตัวที่เกิดขึ้นเอง spontaneous contraction ประมาณ 5 นาที แล้วให้สารทดลอง

การให้สารทดลองแบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1. ให้แบบสะสม (cumulative dose) โดยการให้สารละลาย AC_2 ในขนาดต่าง ๆ กัน ไม่ต้องล้างสารเก่าออก การให้สารแต่ละขนาดห่างกัน 5 นาที ความเข้มข้นของ AC_2 ที่ให้อยู่ระหว่าง $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ M เนื่องจากใช้เอทธานอล (Absolute ethanol) เป็นตัวทำละลายจึงต้องศึกษาผลของเอทธานอลเปรียบเทียบ โดยให้เท่ากับปริมาตรที่ใช้ละลาย AC_2 แต่ละขนาด ความเข้มข้นของเอทธานอลที่ให้อยู่ระหว่าง $2.39 \times 10^{-2} - 8.57 \times 10^{-2}$ M ให้เป็นแบบสะสมเช่นเดียวกัน



รูปที่ 4 เครื่องมือสำหรับการทดลองที่ทำกับลำไส้เล็กของกระต่าย หรือหนูตะเภาที่แยกจากตัวสัตว์ทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ให้ครั้งเดียว (single dose) การทดลองนี้เลือกใช้ AC_2 ความเข้มข้น 8×10^{-6} และ 1×10^{-5} M สำหรับเอทธานอลเลือกใช้ 8.57×10^{-2} M ซึ่งเท่ากับปริมาตรที่ใช้ละลาย AC_2 ขนาด 1×10^{-5} M

2.2 ศึกษาผลของ AC_2 ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวหนูขาว (Isolated rat duodenum)

เตรียมสัตว์ทดลองโดยอดอาหารนาน 15 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำให้หนูสลบโดยการตีที่บริเวณรอยต่อระหว่างหัวและก้านคอ ผ่าตัดเปิดหน้าท้องแยกเอาลำไส้เล็กส่วนต้น duodenum(ห่างจาก stomach ประมาณ 4 เซนติเมตร) ออกมา เตรียมลำไส้เล็กเช่นเดียวกับข้อ 2.1 นำชิ้นลำไส้มาดึงภายใต้แรงดึง 1 กรัม เป็นเวลานาน 45 นาที จึงเริ่มทำการทดลอง ในการทดลองแต่ละครั้งจะให้สารกระตุ้นทำให้เกิดการหดตัวของลำไส้ก่อนเป็นกลุ่มควบคุม 1 ครั้ง หลังจากนั้นจะล้างเนื้อเยื่อหลาย ๆ ครั้งด้วยสารละลายไทโรด เพื่อให้เนื้อเยื่อคลายตัวมาอยู่ในระดับเดียวกันกับก่อนการทดลอง จึงเริ่มให้สารทดลองลงใน organ bath ให้สัมผัสกับเนื้อเยื่อนาน 10 นาที จากนั้นจึงให้สารกระตุ้นซ้ำอีกครั้งหนึ่งในปริมาณเท่ากับการให้ครั้งแรก

2.2.1 ศึกษาผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Carbachol และ Barium chloride

ทำการทดลองโดยให้สารกระตุ้นตามขนาดความเข้มข้นต่างๆ โดยให้แบบสะสมจากความเข้มข้นต่ำสุด และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นโดยไม่ล้างสารเก่าออก นำผลที่ได้ไป plot graph ทำ dose-rosponse curve I ก่อนให้ AC_2 จากนั้นล้างลำไส้ด้วยสารละลายไทโรดหลาย ๆ ครั้ง จนลำไส้คลายตัวสู่สภาพเดิมก่อนการกระตุ้น แล้วจึงให้ AC_2 สัมผัสกับลำไส้นาน 10 นาที โดยไม่ต้องล้างออกแล้วให้สารกระตุ้นชนิดเดิมซ้ำอีกครั้งหนึ่ง นำผลที่ได้ทำ dose-response curve II หลังให้ AC_2 บนกระดาษกราฟแผ่นเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบผลว่าแตกต่างกันหรือไม่ การทดลองนี้ได้เลือกใช้ AC_2 2 ขนาด คือ ความเข้มข้น 8×10^{-6} และ 1×10^{-5} M ตามลำดับ

2.2.2 ศึกษาเปรียบเทียบผลของ AC_2 กับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งสารกระตุ้นดังกล่าวได้แก่ atropine (7.2×10^{-9} M) Verapamil (2.2×10^{-8} M) และดูผลของ Absolute ethanol (8.57×10^{-2} M) ร่วมด้วย ทำการทดลองโดยใช้วิธีการทดลองแบบเดียวกับข้อ 2.2.1

2.3 ศึกษาผลของ AC_2 ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวหนูตะเภา (Isolated Guinea-pig ileum)

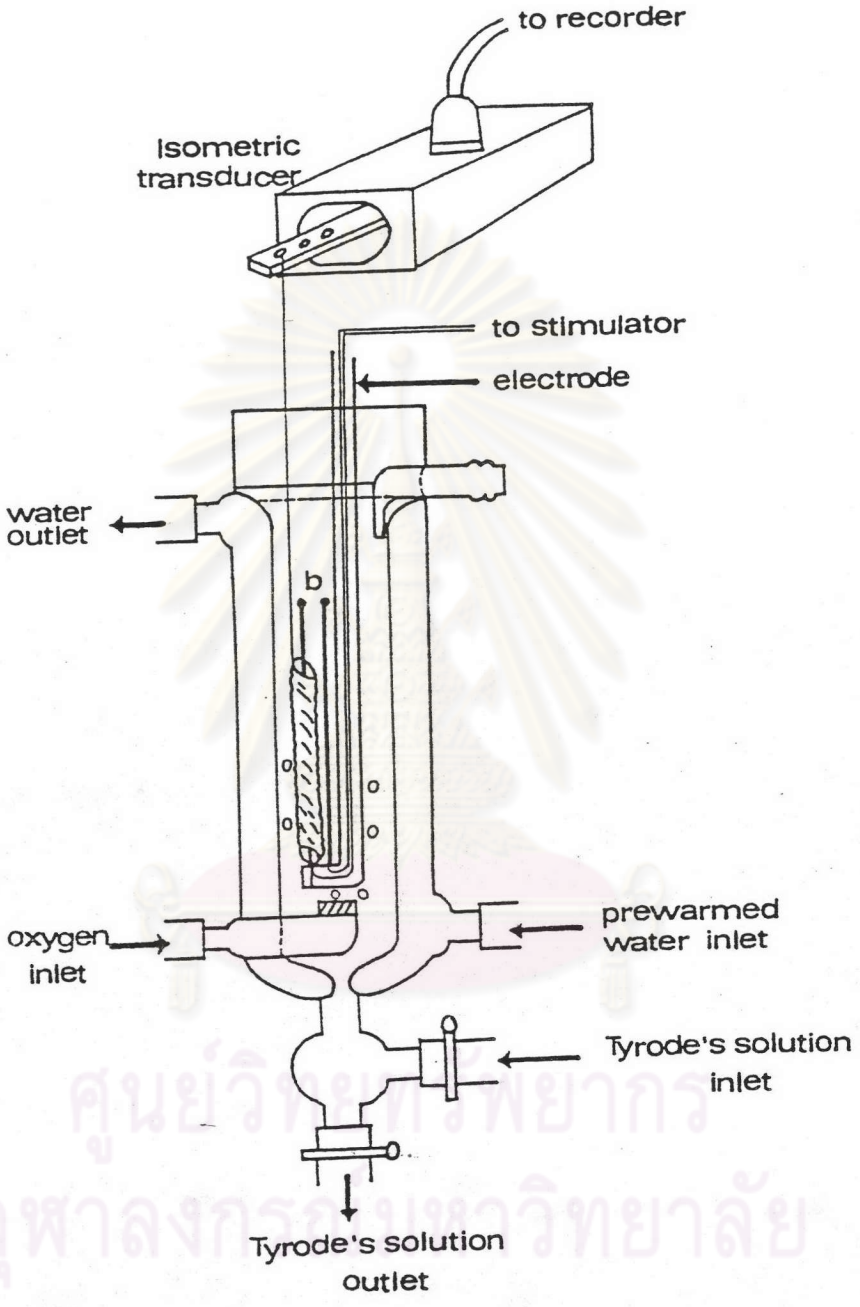
เตรียมสัตว์ทดลองโดยอดอาหารหนูตะเภานาน 15 ชั่วโมง นำหนูมาทำให้สลบโดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างหัวและก้านคอ ผ่าตัดเปิดหน้าท้อง แยกเอาลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ออกมา ตัดลำไส้ให้ได้ความยาวชิ้นละ 1-2 เซนติเมตร เตรียมลำไส้เช่นเดียวกับในข้อ 2.1 นำชิ้นลำไส้มาดึงภายใต้แรงตึง 1 กรัม ควบคุมสภาพต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 2.1 ปล่อยชิ้นลำไส้ให้ปรับตัวในสารละลายไทโรดนาน 45 นาที จึงเริ่มทำการทดลองดังนี้

2.3.1 ศึกษาผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภา ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีที่ทำให้เกิดการหดตัวได้แก่ Acetylcholine, Barium chloride และ Serotonin (5-HT)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่เปลี่ยนสารกระตุ้นเป็น Acetylcholine, Barium chloride และ Serotonin ตามลำดับ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่ได้ด้วย Oscillograph recorder นำผลที่ได้มาเขียนกราฟโดยทำ dose-response curve ก่อนและหลังให้ AC_2 เพื่อเปรียบเทียบผลว่าแตกต่างกันหรือไม่

2.3.2 ศึกษาเปรียบเทียบผลของ AC_2 กับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งสารกระตุ้นดังกล่าวได้แก่ atropine, verapamil และ cyproheptadine

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่เปลี่ยนจากการให้ AC_2 สัมผัสลำไส้นาน 10 นาที เป็นให้สารยับยั้งสารกระตุ้นต่าง ๆ สัมผัสลำไส้นาน 10 นาที ตามลำดับ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่ได้แล้วนำมาเขียนกราฟ ทำ dose-response curve ก่อนและหลังให้ atropine, verapamil และ cyproheptadine เพื่อเปรียบเทียบผลว่าแตกต่างจาก AC_2 หรือไม่



รูปที่ 5 เครื่องมือสำหรับการทดลองที่กระตุ้นลำไส้เล็กหนูตะเภาด้วยไฟฟ้าแบบ coaxial stimulation

b เป็นลวดทองคำขาว ซึ่งใช้เป็นอิเลคโตรดภายในและภายนอกตามลำดับ

015939

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.3 ศึกษาผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภาในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายดีโปลาไรด์ด้วยโปแตสเซียม (Potassium-depolarizing tyrode's solution) (ตารางที่ 1)

เตรียมลำไส้เล็กเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 นำชิ้นลำไส้มาดึงภายใต้แรงตึง 1 กรัม ในสารละลายไทโรดเป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนสารละลายใน organ bath เป็นสารละลายดีโปลาไรด์ด้วยโปแตสเซียม ล้างลำไส้ด้วยสารละลายดังกล่าวหลาย ๆ ครั้ง ลำไส้จะค่อย ๆ คลายตัวจนกลับคืนสู่สภาพเดิม จากนั้นให้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 mM ลำไส้จะหดตัวเมื่อลำไส้หดตัวสูงสุดแล้ว ให้ AC_2 บันทึกผลการทดลองต่อนานประมาณ 20 นาที

การทดลองนี้เพื่อทดสอบดูผลของ AC_2 ขนาดความเข้มข้น $8x10^{-6}$ และ $1x10^{-5}$ M รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบผลของ Absolute ethanol (8.57×10^{-2} M) ร่วมด้วย

2.3.4 ศึกษาผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภา ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

เตรียมลำไส้เล็กเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 นำชิ้นลำไส้มากระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้อิเลคโตรด ลวดทองคำขาวที่มี 2 ขั้วขนานกัน ขั้วหนึ่งจะอยู่ใน lumen ของลำไส้ ส่วนขั้วที่เหลือจะอยู่ภายนอกลำไส้ ผูกด้ายที่ปลายทั้ง 2 ของลำไส้ ปลายด้านหนึ่งผูกที่ขอด้านล่างของอิเลคโตรด ปลายอีกด้านผูกกับ Isometric transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องบันทึก (Oscillograph recorder) (รูปที่ 5) ปล่อยชิ้นลำไส้ให้ปรับตัวในสารละลายไทโรดนาน 45 นาที จึงเริ่มทำการทดลองโดยกระตุ้นลำไส้ให้เกิดการหดตัวด้วยเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 10 V, ความถี่ 0.2 Hz และใช้ square wave pulse duration 2.5 m sec. (Fosbrey & Johnson, 1980) กระตุ้นนานประมาณ 3 นาที หลังจากนั้นหยุดการกระตุ้นแล้วให้ AC_2 นาน 10 นาที แล้วจึงเริ่มการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

การทดลองนี้เพื่อทดสอบดูผลของ AC_2 ขนาดความเข้มข้น 8×10^{-6} และ 1×10^{-5} M รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบผลของ Absolute ethanol (8.57×10^{-2}M) และ Atropine (7.2×10^{-9} M) ด้วยวิธีการเดียวกัน

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองจะรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ Standard Errors of the Means)

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้ Student's unpaired t-test ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

การคำนวณค่า drug parameter ใช้วิธีคำนวณของ Van Rossum (1963)

pA_2 แสดงถึง logarithm affinity ของ competitive antagonist

คำนวณโดย $pA_2 = -\log[B[+ \log(\frac{[A_B]}{[A_o]} - 1)$

B = คือความเข้มข้นของสารยับยั้งตัวกระตุ้นชนิดแย่งจับรีเซปเตอร์เดียวกันในหน่วยโมลาร์

A_B = คือความเข้มข้นของสารกระตุ้นในหน่วยโมลาร์ที่ทำให้เกิดการตอบสนองได้ 50% ในสภาวะที่มีสารยับยั้งตัวกระตุ้นชนิดแย่งจับรีเซปเตอร์เดียวกันด้วย

A_o = คือความเข้มข้นของสารกระตุ้นในหน่วยโมลาร์ที่ทำให้เกิดการตอบสนองได้ 50% ในสภาวะที่ไม่มีสารยับยั้งตัวกระตุ้น

pD'_2 แสดงถึง logarithm affinity ของ non-competitive antagonist

คำนวณโดย $pD'_2 = -\log[B'] + \log (\frac{[E_{Am}]}{[E_{AmB}']} - 1)$

B' = คือความเข้มข้นของสารยับยั้งตัวกระตุ้นชนิดไม่แย่งที่รีเซปเตอร์เดียวกันในหน่วยโมลาร์

E_{Am} = คือ การหดตัวสูงสุดที่เกิดจากสารกระตุ้นในสภาวะที่ไม่มีสารยับยั้งสารกระตุ้น

$E_{AmB'}$ = คือ การหดตัวสูงสุดที่เกิดจากสารกระตุ้นในสภาวะที่มีสารยับยั้งการกระตุ้นอยู่ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย