



บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ สารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

ใช้สัตว์ทดลองจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม 2 ชนิด ได้แก่

หนูขาว (wistar rat) น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม

หนูถีบจักร (mice) น้ำหนักประมาณ 20-22 กรัม

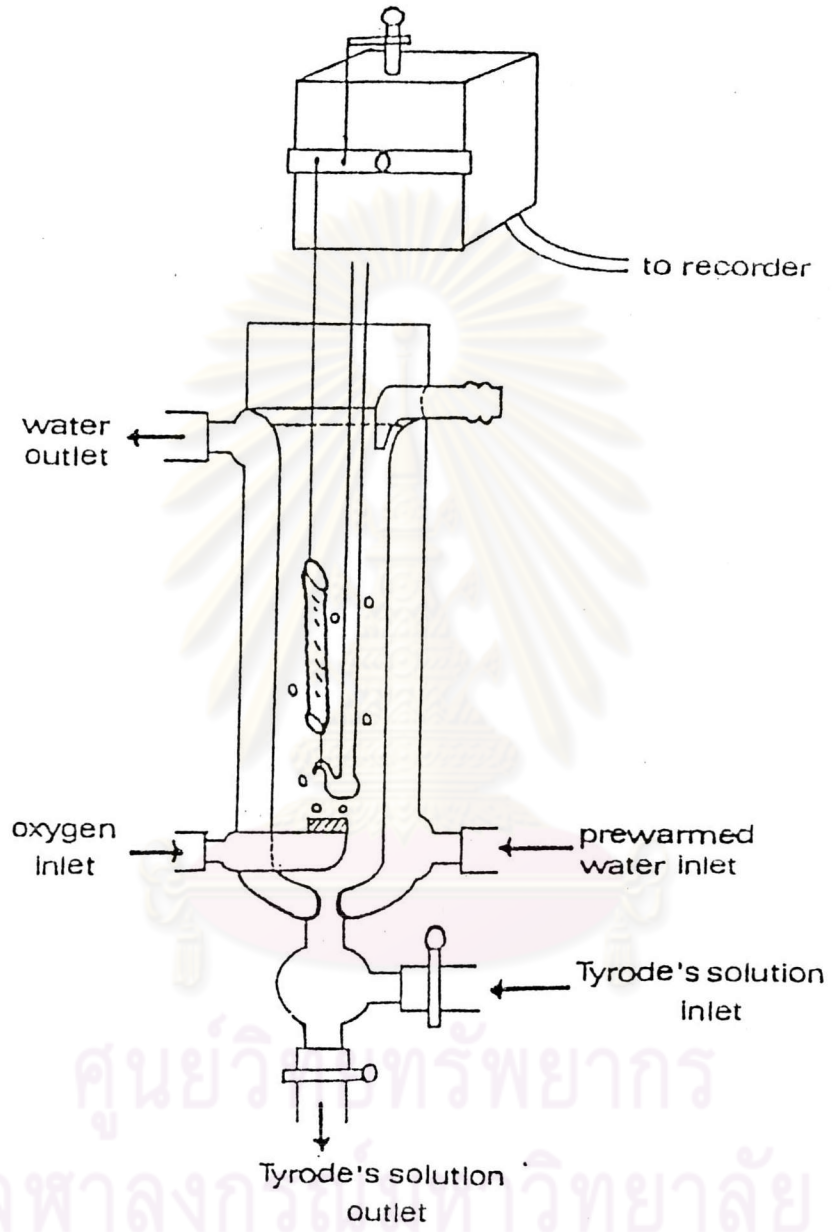
2. เครื่องมือ

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) ซึ่งจะส่งน้ำให้ไหลเข้าออกในชั้นนอกนี้อย่างสม่ำเสมอ และ organ bath ยังมีช่องทางเปิดให้อากาศซึ่งประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และก๊าซออกซิเจน 95% ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นในได้ (ดูรูปที่ 2)

2.2 ชุด isolated organ bath ของบริษัท C.P. Palmer, thermoregulating water pump Churchill type และที่ทำเองในประเทศไทย

2.3 เครื่องมือวัดแรงหดเกร็ง isotonic isometric และ pressure transducer ของบริษัท Washington transducer

isotonic transducer



รูปที่ 2 รูป organ bath แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับการทดลองที่ทำกับ กระเพาะอาหารหนูขาวที่แยกจากตัวสัตว์ทดลอง

ศึกษาผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร 3 ชนิด (AC₁, AC₂ และ AC₃) ต่อการหดเกร็งของกระเพาะอาหารหนูขาวนอกร่างกาย (in vitro)

เตรียมกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวตามวิธีของ Vane (1957) โดยทำให้หนูขาวสลบด้วยการทุบระหว่างรอยต่อของหัวและต้นคอ ริมเปิดหน้าท้อง ตัดเอาส่วนของกระเพาะอาหารออกมาทั้งหมดใส่ลงใน petri-dish ที่บรรจุ Tyrode's solution (ส่วนประกอบของสารละลายแสดงไว้ในตารางที่ 1) และมีก๊าซ (O₂ 95% + CO₂ 5%) ไหลผ่าน ตัดส่วนของ fundus แยกออกมา แล้วตัดให้อยู่ในรูปของ fundus strip แบบ longitudinal (รูปที่ 3) ชิ้นเนื้อที่ตัดมาเพื่อใช้ในการทดลองควรมีความกว้างประมาณ 1.5 มม. ยาวประมาณ 2 ซม. นำปลายด้านหนึ่งของชิ้นเนื้อไปผูกกับแท่งแก้ว แล้วใส่ลงในกระเปาะแก้ว 2 ชั้นซึ่งภายในบรรจุด้วย Tyrode's solution ที่มีก๊าซ (O₂ 95% + CO₂ 5%) ผ่านตลอด ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ต่อไปให้นำปลายอีกด้านหนึ่งของชิ้นเนื้อไปผูกติดกับเส้นด้ายซึ่งผูกติดกับ isotonic transducer ที่ต่อกับเครื่องบันทึกผลการทดลอง (polygraph) เมื่อเตรียมตามวิธีข้างต้นเสร็จแล้ว ให้ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงตัวประมาณ 1 กรัมแล้ว incubate ไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ในขณะที่ incubate ชิ้นเนื้อต้องเปลี่ยน Tyrode's solution ทุก 15 นาที

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรต่อการยับยั้งการหดเกร็งของกระเพาะอาหาร จะเลือกใช้สารทดลองที่มีความเข้มข้น $1.5 \times 10^{-5}M$ และ $1.5 \times 10^{-6}M$ และใช้สารกระตุ้นการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ 2 ชนิด คือ acetylcholine (ACh) และ calcium chloride (CaCl₂) แล้วศึกษาหาค่า cumulative dose-response curve ตามวิธีของ Van Rossum และ Hurkmans และ Wolters (1963) ในการทดลองที่ใช้ ACh เป็นสารกระตุ้น เมื่อหาค่า cumulative dose-response curve ได้แล้ว ให้ล้างสารกระตุ้นออกด้วย Tyrode's solution หลาย ๆ ครั้ง จนสังเกตเห็นกล้ามเนื้อที่มีสภาพกลับคืนสู่ระดับปกติ (base line) แล้วเติมสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรตัวที่ต้องการทดลองลงไป ในกระเปาะแก้วตามขนาดที่ต้องการ 5 นาทีจึงเริ่มให้สารกระตุ้นใหม่แล้วหาค่า cumulative dose - response curve อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบผลก่อนและหลังการใช้สารสกัดจากฟ้าทะลายโจร

สำหรับการทดลองที่ใช้ CaCl₂ เป็นสารกระตุ้นการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหาร จะเปลี่ยนไปใช้สารละลายแบบ high-potassium calcium-free depolarizing

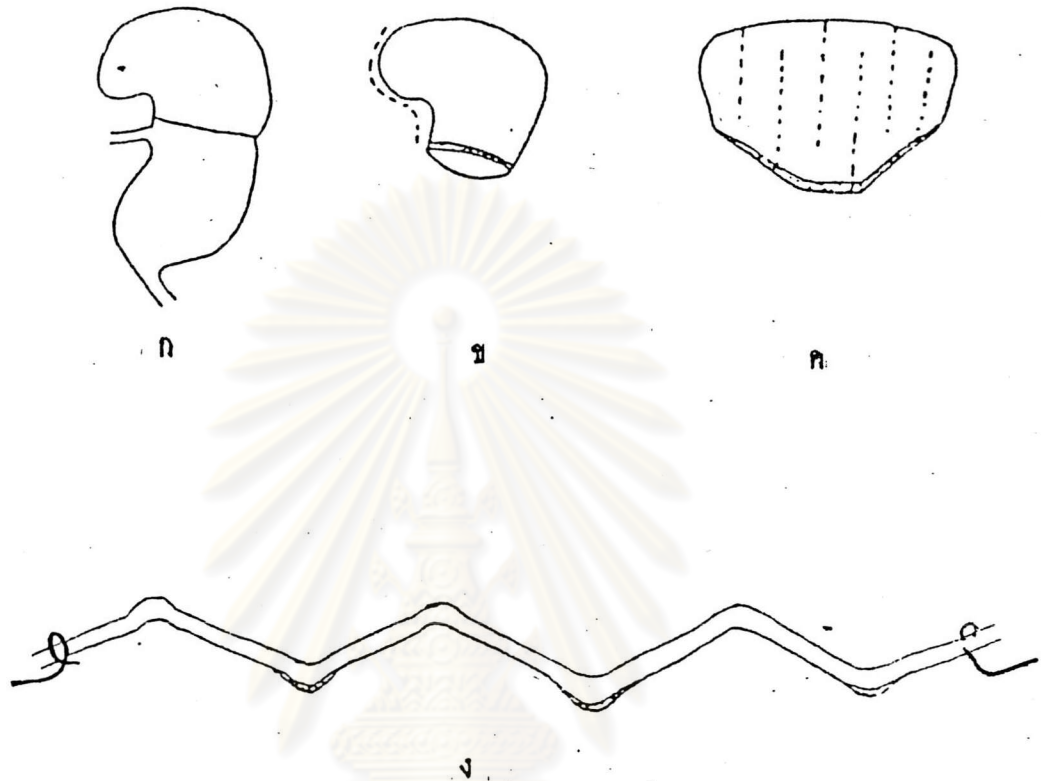
ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของเกลือชนิดต่าง ๆ ใน physiological solution (กรัม/ลิตร)

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 ₂ PO ₄	0.05	--
Glucose	1.0	1.98

Gas 95% O₂ plus 5% CO₂

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการตัดกระเพาะอาหารหนูขาวให้อยู่ในรูป fundus strip
- ก. กระเพาะอาหารหนูขาวทั้งกระเพาะ ส่วนบนเป็นส่วน fundus
 - ข. เปิด fundus โดยตัดส่วนที่เป็น lesser curvature (เส้นประ)
 - ค. เมื่อตัดตามเส้นประ ดังรูป
 - ง. รูป fundus strip

solution (Van Den Bruck และ Lemi, 1980) โดยภายหลังจากการ incubate กล้ามเนื้อกระเพาะอาหาร 1 ชั่วโมงด้วย Tyrode's solution แล้ว ให้เปลี่ยนเป็น potassium-depolarizing Tyrode's solution (ดูส่วนประกอบในตารางที่ 1) และ เปลี่ยนสารละลายนี้ต่อไปทุก 10-15 นาที ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง จะพบว่ากล้ามเนื้อคลายตัวและรักษาระดับคงที่ปกติ (base line) จึงเริ่มทำการทดลองหาค่า cumulative dose-response curve ของ CaCl_2 ตามวิธีของ Van Rossum และคณะ (1963)

ต่อไปทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากห้ทะเลลายโจรทั้ง 3 ชนิด (AC_1 , AC_2 และ AC_3) กับสารยับยั้งมาตรฐาน 2 ชนิดได้แก่ อะโทรปีน (atropine) ความเข้มข้น 1×10^{-8} M (เมื่อใช้ ACh เป็นสารกระตุ้น) และ เวอราปามิล (verapamil) ความเข้มข้น 5×10^{-8} M (เมื่อใช้ CaCl_2 เป็นสารกระตุ้น)

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากห้ทะเลลายโจร 3 ชนิด (AC_1 , AC_2 และ AC_3) ต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรที่แยกออกมาจากร่างกาย (in vitro)

การทดลองจะใช้หนูถีบจักรน้ำหนัก 20-22 กรัม อุดอาหารโดยให้แต่น้ำอย่างเดียวก่อนการทดลอง 16-24 ชั่วโมง ทำให้หนูสลบโดยทุบระหว่างรอยต่อของหัวและต้นคอเปิดหน้าท้องแยกเอากระเพาะอาหารออกมาล้างกระเพาะอาหารภายในให้สะอาด โดยการฉีด Tyrode's solution เข้าทางสาย polyethylene ซึ่งผูกติดแน่นไว้กับกระเพาะอาหารส่วนที่ต่อกับหลอดอาหาร ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของสาย polyethylene จะต่อกับ three-way stop-cock ซึ่งต่อเข้ากับ pressure transducer เพื่อทำหน้าที่สำหรับวัดแรงดันภายในกระเพาะอาหาร ฉีด Tyrode's solution ผ่านทาง three-way โดยให้ Tyrode's solution ลงไปในกระเพาะอาหารและไล่ห้องอากาศออกไปต่อมารีบผูกปลายกระเพาะอาหารส่วนที่ต่อกับลำไส้เล็กให้ปิดสนิทแช่กระเพาะไว้ในกระเพาะแก้ว 2 ชั้น ปรับความดันภายในกระเพาะให้มีค่าประมาณ 25-30 ม.ม.ของน้ำแล้ว incubate ไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทำการทดลอง

การทดลองนี้เลือกใช้สารสกัด AC_1 , AC_2 และ AC_3 ความเข้มข้น 1.5×10^{-5} M เพื่อจะให้เห็นผลการออกฤทธิ์ชัดเจน และใช้สารกระตุ้น ACh ความเข้มข้น 1×10^{-6} M และ CaCl_2 ความเข้มข้น 1×10^{-3} M วิธีการทดลองมีดังนี้

- ศึกษาฤทธิ์ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ต่อการบีบตัวของกระเพาะอาหาร หนูถีบจักรโดยให้กล้ำเนื้อกระเพาะอาหารได้รับสารกระตุ้น แล้วจึงล้างสารกระตุ้นออกจากระเพาะอาหารคล้ายตัวสู่ระดับปกติ (base line) ต่อไปให้สารทดลอง 5 นาที แล้วจึงเริ่มให้สารกระตุ้นใหม่อีกครั้งหนึ่ง เปรียบเทียบผลการหดเกร็งของกล้ามเนื้อก่อนและหลังจากที่ได้รับสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร

- ศึกษาฤทธิ์ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ขณะเกิดการหดเกร็งสูงสุดของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรเมื่อได้รับสารกระตุ้นโดยเมื่อกล้ำเนื้อกระเพาะอาหารได้รับสารกระตุ้นแล้วรอกจนกระทั่งกล้ามเนื้อเกิดการหดเกร็งสูงสุด จึงให้ AC_1 , AC_2 และ AC_3 หากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อที่เกิดจากสารกระตุ้นชนิดนั้นได้กล้ามเนื้อจะคลายตัวทันที

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

(mean \pm standard errors of the mean)

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมใช้ student's paired t-test ส่วนการเปรียบเทียบผลของกลุ่มทดลองจากสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรแต่ละชนิดใช้ student's unpaired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

การคำนวณค่า drug parameter ใช้วิธีของ Van Rossum และคณะ (1963) โดยค่า logarithm ของ affinity ของ competitive antagonist แสดงในรูป pA_2 ส่วน non-competitive antagonist จะแสดงในรูป pD'_2 value คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$pA_2 = -\log [B] + \log \left(\frac{[A_B]}{[A_O]} - 1 \right)$$

B คือ ความเข้มข้นของสารยับยั้งตัวกระตุ้น (competitive antagonist) ในหน่วยโมลาร์

A_B และ A_0 คือ ความเข้มข้นของสารกระตุ้น (agonist) ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิด 50% response เมื่อมี antagonist และไม่มี antagonist ตามลำดับ

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

B' คือ ความเข้มข้นของสารยับยั้งตัวกระตุ้น (non-competitive antagonist) ในหน่วยโมลาร์

E_{Am} , $E_{AmB'}$ คือ การหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจาก สารกระตุ้น (agonist) เมื่อไม่มีสารยับยั้งตัวกระตุ้นและมีสารยับยั้งตัวกระตุ้นอยู่ด้วยตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย