บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1.สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป

กระต่ายสายพันธุ์ New Zeland เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 2-3 กิโลกรัม จากคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป

2.เครื่องมือ

2.1 organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วย หลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) ขนาดบรรจุ 20 มิลลิลิตร มีช่องสำหรับการผ่านเข้าออกของก๊าซ Carbogen (ประกอบด้วย O_2 95% และ CO_2 5%) ชั้นนอกมีน้ำอุ่นซึ่งส่งมาจาก water bath โดย thermoregulating water pump คอยควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ ที่ 37 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส

2.2 water bath และ thermoregulation water pump

2.3 เครื่องมือวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ isometric, isotonic และ pressure transducer ของบริษัท Washington transducer

2.4 เครื่องบันทึกผลการทดลอง Universal Oscillograph ของบริษัท Harvard

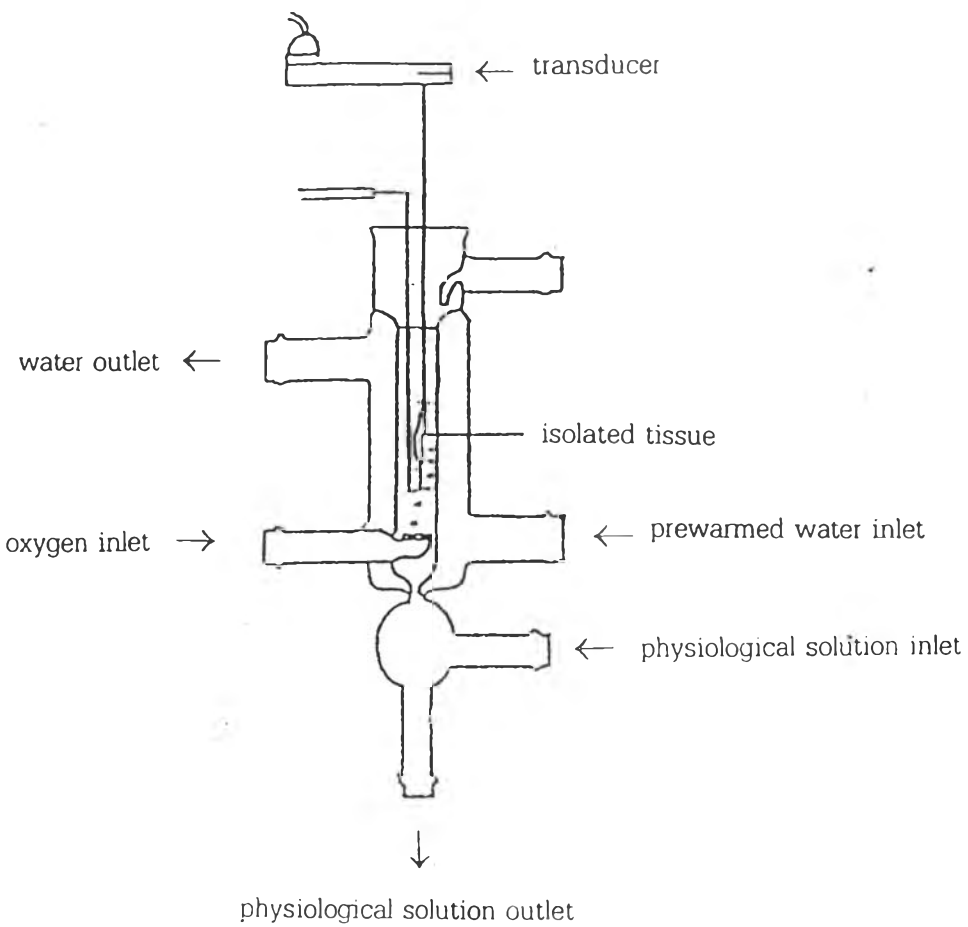
2.5 เครื่องบันทึกผลการทดลองพร้อมด้วยเครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้า Gilson N2 ของบริษัท Harvard

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

acetylcholine hydrochloride (Sigma)

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex (Sigma)



ภาพที่ 5 การจัดเครื่องมือ organ bath สำหรับทดลองกับ isolated

norepinephrine (Sigma)

potassium chloride (Sigma)

barium chloride (Sigma)

3.2 สารทดลอง

CU 763-15-13 เป็นสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์โดย ผศ.ดร.ชำนาญ ภัตรพานิช โดยเตรียมในรูปสารละลาย ที่ใช้ dimethysulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย

4.Carbogen gas

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบ

1.1 การเตรียมลำไส้เล็ก (duodenum rabbit) กระต่าย

ใช้กระต่ายเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม โดยอดอาหารก่อนการทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้แต่น้ำ ทำให้กระต่ายตายทันทีด้วยการตีหัวบริเวณท้ายทอยแล้วทำ cervical dislocation ผ่าผนังหน้าท้องนำเอาลำไส้เล็ก ส่วน duodenum แช่ในสารละลาย tyrode ใน petri dish ซึ่งมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันออกให้หมด ใช้ syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร สำหรับล้างภายในลำไส้ ด้วยสารละลาย tyrode แล้วตัดให้มีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย tyrode อยู่ 20 มิลลิลิตร และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา อุณหภูมิ 37 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผลและขยายสัญญาณไฟฟ้า ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว incubate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที ระหว่างนี้จะเปลี่ยนสารละลาย Tyrode ทุก 15 นาที จนกระทั่งกล้ามเนื้อมีความตึงคงที่

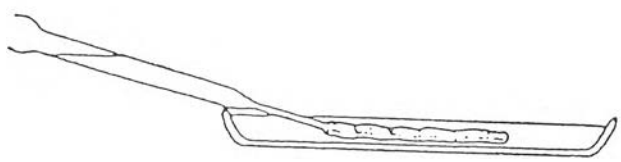
1.2 การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) กระต่าย

ใช้กระต่ายเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม ทำให้กระต่ายตายทันทีด้วยการตีหัวบริเวณท้ายทอยแล้วทำ cervical dislocation ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายหัวใจ ปอด ออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่ที่กระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ออกจากตัวมาวางบน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit ซึ่งมีก๊าซ carbogen

← ลำไส้เล็กส่วน duodenum

↓

การล้าง lumen

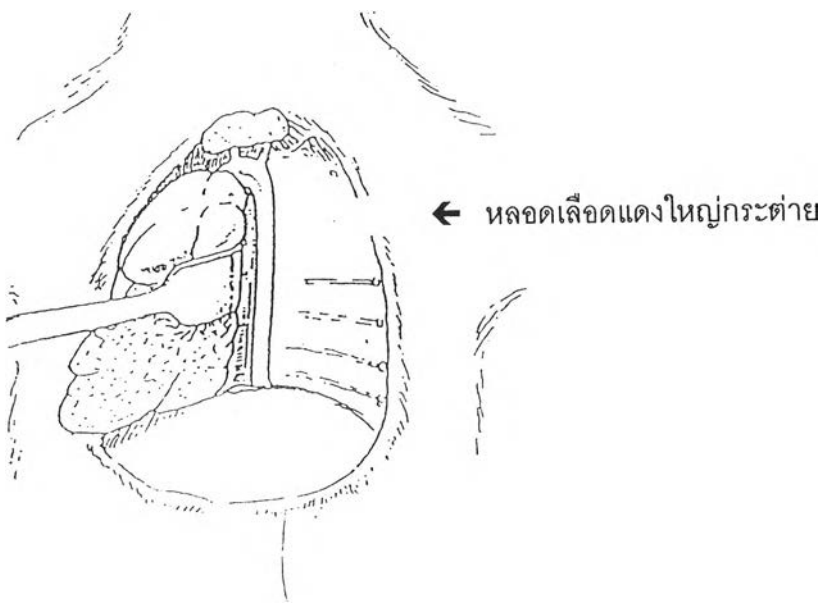


↓

วิธีการผูกลำไส้เล็กส่วน duodenum

ภาพที่ 6 ตำแหน่งลำไส้เล็กส่วน duodenum และการผูกลำไส้เล็ก

ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ตัดหลอดเลือดเป็นเกลียว (spiral) แล้วตัดแบ่งยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Krebs-Henseleit อยู่ 20 มิลลิลิตร และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผลและขยายสัญญาณไฟฟ้า ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว incubate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที ระหว่างนี้จะเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที จนกระทั่ง กล้ามเนื้อมีความตึงคงที่



ภาพที่ 7 ตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่ (thoracic aorta)

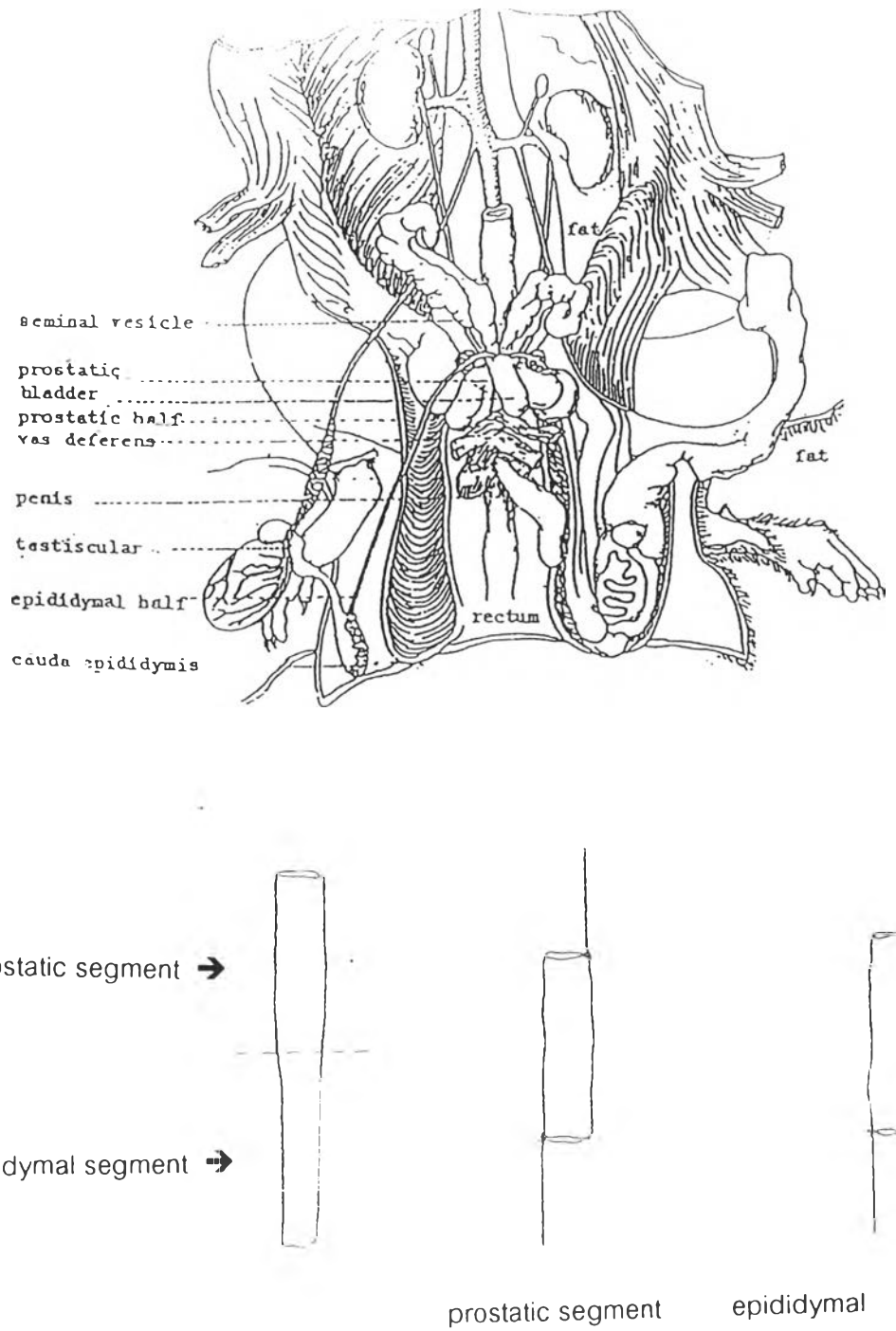
1.3 การเตรียมกล้ามเนื้อท่อนำอสุจิ (vas deferens)หนูขาว

ใช้หนูขาวเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม ทำให้หนูตายทันทีด้วยการตีหัวบริเวณท้ายทอยแล้วทำ cervical dislocation ผ่าตัดเปิดช่องท้องแยกท่อนำอสุจิ แช่ในสารละลาย Krebs-Henseleit บน petri dish ซึ่งมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและหลอดเลือดออกให้หมด ใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร สำหรับล้างภายในท่ออสุจิ ด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit แล้วตัดให้มีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Krebs-Henseleit อยู่ 20 มิลลิลิตร และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผลและขยายสัญญาณไฟฟ้า ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 0.5 กรัม แล้ว incubate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที ระหว่างนี้จะเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที จนกระทั่ง กล้ามเนื้อมีความตึงคงที่

1.4 การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) หนูขาว

ใช้หนูขาวเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม ทำให้หนูตายทันทีด้วยการตีหัวบริเวณท้ายทอยแล้วทำ cervical dislocation ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายหัวใจ ปอด ออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่ที่กระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ออกจากตัวมาวางบน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit ซึ่งมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ตัดหลอดเลือดเป็นเกลียว (spiral) แล้วตัดแบ่งยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Krebs-Henseleit อยู่ 20 มิลลิลิตร และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผลและขยายสัญญาณไฟฟ้า ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว incubate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที ระหว่างนี้จะเปลี่ยนสารละลาย Kreb Henseleit ทุก 15 นาที จนกระทั่ง กล้ามเนื้อมีความตึงคงที่

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 8 ตำแหน่งท่อนำอสุจิ (vas deferen) และการผูกท่อนำอสุจิหนูขาว

2. การทดลอง

2.1 ศึกษาผลเบื้องต้นของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กที่แยกจากกระต่าย

2.1.1 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กกระต่ายเมื่อเกิด spontaneous contraction

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Tyrode จนลำไส้เล็กเกิด spontaneous contraction มีการหดตัวที่สม่ำเสมอและคงที่ บันทึกผลการหดตัว แล้วจึงให้ CU 763-15-13 ขนาด $5x10^{-5}$ M บันทึกผลการหดตัวต่อไปประมาณ 5 นาที ให้ CU 763-15-13 ขนาด $1x10^{-4}$ M บันทึกผลการหดตัว เปรียบเทียบผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กก่อนและหลังการให้ CU 763-15-13

2.1.2 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กกระต่ายเมื่อให้สารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆดังนี้

acetylcholine hydrochloride ขนาด $1x10^{-7}$ M

potassium chloride 50 mM

barium chloride $1x10^{-3}$ M

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Tyrode จนมีการหดตัวที่สม่ำเสมอและคงที่ กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กให้หดตัวโดยใช้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น บันทึกผลการหดตัวประมาณ 20-30 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Tyrode หลายๆครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Tyrode ทุก 15 นาที จนกระทั่งความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ ศึกษาผลของ CU 763-15-13 โดยการให้สารกระตุ้นมาตรฐานในขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวประมาณ 5 นาที ให้ CU 763-15-13 ขนาด $5x10^{-5}$ M บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีกประมาณ 5 นาที แล้วจึงให้ CU 763-15-13 ขนาด $1x10^{-4}$ M แล้วบันทึกผลการหดตัวไปประมาณ 5 นาที เปรียบเทียบผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กก่อนและหลังการให้ CU 763-15-13

2.2 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

2.2.1 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิหนูขาว ในสารละลาย Krebs-Henseleit เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆดังนี้

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex ขนาด $1x10^{-5}$ M

norepinephrine $1x10^{-6}$ M

barium chloride $1x10^{-3}$ M

potassium chloride 50 mM

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น บันทึกผลการหดตัวประมาณ 20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย tyrode 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ CU 763-15-13 โดยการให้ CU 763-15-13 ขนาด $5x10^{-5}$ M เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิก่อนและหลังการให้ CU 763-15-13

2.2.2 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ในสารละลาย Krebs-Henseleit เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆดังนี้

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex ขนาด $1x10^{-5}$ M

norepinephrine $1x10^{-6}$ M

barium chloride $1x10^{-3}$ M

potassium chloride 50 mM

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น บันทึกผลการหดตัวประมาณ 20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ CU 763-15-13 โดยการให้ CU 763-15-13 ขนาด $5x10^{-5}$ Mเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ก่อนและหลังการให้ CU 763-15-13

2.2.3 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย ในสารละลาย Krebs-Henseleit เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆดังนี้

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex ขนาด $1x10^{-6}$ M

norepinephrine $1x10^{-6}$ M

barium chloride $1x10^{-3}$ M

potassium chloride 50 mM

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น บันทึกผลการหดตัวประมาณ 20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ CU 763-15-13 โดยการให้ CU 763-15-13 ขนาด $5x10^{-5}$ Mเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ก่อนและหลังการให้ CU 763-15-13

2.2.4 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อ Cumulative dose-response curve ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย Calcium chloride ในสารละลาย potassium depolarizing

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย potassium depolarizing และ incubate ต่อจนความตึงของกล้ามเนื้อคงที่ แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด ($1x10^{-5}$ M – $1x10^{-2}$ M) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ CU 763-15-13 โดยการให้ CU 763-15-13 ขนาด $5x10^{-5}$ M และ $1x10^{-5}$ M ก่อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง Cumulative dose-response curve ของ $CaCl_2$ เมื่อมีและไม่มี CU 763-15-13

2.2.5 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อ Cumulative dose-response curve ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย norepinephrine เมื่อมีและไม่มี endothelium

2.2.5.1 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อ Cumulative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วย norepinephrine เมื่อมี endothelium

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ แล้วให้ norepinephrine แบบสะสมขนาด ($1x10^{-10}$ M – $1x10^{-6}$ M) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนกระทั่งความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ CU 763-15-13 โดยการให้ CU 763-15-13 ขนาด $5x10^{-5}$ M และ $1x10^{-5}$ M ก่อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้ NE แบบสะสมขนาด เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง Cumulative dose-response curve ของ NE ก่อนและหลังการให้ CU 763-15-13

2.2.5.2 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อ Cumulative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วย norepinephrine เมื่อไม่มี endothelium

เตรียมกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ขูด endothelium ออกโดยใช้ไม้พันสำลีขูดเบาๆด้านในของหลอดเลือด และใช้ Acetylcholine ซึ่งเป็น endothelium dependent vasodilator เป็นตัวทดสอบว่าไม่มี endothelium แล้วจึงนำมาทดสอบฤทธิ์ของ CU 763-15-13 โดยทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อ Cumulative dose-response curve กระตุ้นด้วย norepinephrine เมื่อมี endothelium

2.2.6 ศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit เมื่อกระตุ้นให้สารกระตุ้นมาตรฐาน

norepinephrine $1x10^{-6}$ M

potassium chloride 50 mM

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit และ incubate ต่อจนความตึงของกล้ามเนื้อคงที่ แล้วให้สารกระตุ้นมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น บันทึกผลการหดตัวประมาณ 20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย

Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ CU 763-15-13 โดยการให้ CU 763-15-13 ขนาด $5x10^{-5}$ Mเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ก่อนและหลังการให้ CU 763-15-13

2.3 ศึกษาผลของ papaverine ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

2.3.1 ศึกษาผลของ papaverine ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิหนูขาว ในสารละลาย Krebs-Henseleit เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆดังนี้

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex ขนาด $1x10^{-5}$ M

norepinephrine $1x10^{-6}$ M

barium chloride $1x10^{-3}$ M

potassium chloride 50 mM

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น บันทึกผลการหดตัวประมาณ 20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย tyrode 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ papaverine โดยการให้ papaverine ขนาด $5x10^{-5}$ M เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิก่อนและหลังการให้ papaverine

2.3.2 ศึกษาผลของ papaverine ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ในสารละลาย Krebs-Henseleit เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆดังนี้

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex ขนาด $1x10^{-5}$ M

norepinephrine $1x10^{-6}$ M

barium chloride $1x10^{-3}$ M

potassium chloride 50 mM

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น บันทึกผลการหดตัวประมาณ 20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-

Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ papaverine โดยการให้ papaverine ขนาด $5x10^{-5}$ M เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ก่อนและหลังการให้ papaverine

2.3.3 ศึกษาผลของ papaverine ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย ในสารละลาย Krebs-Henseleitเมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆดังนี้

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex ขนาด $1x10^{-5}$ M

norepinephrine $1x10^{-6}$ M

barium chloride $1x10^{-3}$ M

potassium chloride 50 mM

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น บันทึกผลการหดตัวประมาณ 20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ papaverine โดยการให้ papaverine ขนาด $5x10^{-5}$ M เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ก่อนและหลังการให้ papaverine

2.3.4 ศึกษาผลของ papaverine ต่อ Cumulative dose-response curve ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย Calcium chloride ในสารละลาย potassium depolarizing

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย potassium depolarizing และ incubate ต่อจนความตึงของกล้ามเนื้อคงที่ แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด ($1x10^{-5}$ M – $1x10^{-2}$ M) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3 ครั้ง incubate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที จนความตึงของกล้ามเนื้อเท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที ศึกษาผลของ papaverine โดยการให้ papaverine ขนาด $5x10^{-5}$ M และ $1x10^{-5}$ M ก่อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง Cumulative dose-response curve ของ $CaCl_2$ เมื่อมีและไม่มี papaverine

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดย paired student's t-test พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

การคำนวณค่า parameter

ทำโดยใช้วิธีของ Van Rossum, Hurkmans และ Wolters (1963) ดังนี้

1.ค่า Logarithm ของ affinity ของ Competitive antagonist

แสดงในรูป pA_2 ซึ่งคือค่า negative logarithm ของความเข้มข้นของตัวยับยั้งชนิดแย่งจับที่ตัวรับสัมผัสเดียวกัน (Competitive antagonist) ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของตัวกระตุ้น (agonist) เป็นสองเท่า จึงจะได้การตอบสนองเท่าเดิม

pA_2 คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$pA_2 = -\log [B] + \log([A_B]/[A_0]-1)$$

[B] คือ ความเข้มข้นของ Competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

$[A_B]$ คือ ความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิดเการกระตุ้น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมี antagonist (B) อยู่ด้วย

2.ค่า Logarithm ของ affinity ของ Non-competitive antagonist

แสดงในรูป pD_2'ซึ่งคือค่า negative logarhitm ของความเข้มข้นของตัวยับยั้งชนิดไม่แย่งจับที่ตัวรับสัมผัสเดียวกัน (Non-competitive antagonist) ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้การตอบสนองสูงสุด (maximum response) ที่เกิดจากตัวกระตุ้น (agonist) ลดลง 50%

pD_2' คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

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

[B′] คือ ความเข้มข้นของ Non-competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

$[A_{Am}]$ คือ ค่าการหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้น เมื่อไม่มีสารยับยั้ง (Non-competitive antagonist)

$[A_{AmB}']$ คือ ค่าการหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้น เมื่อมีสารยับยั้ง (Non-competitive antagonist) อยู่ด้วย