บทที่ 2

การดำเนินการวิจัย

<u>สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี</u>

1. สัตว์ทดลอง

1.1 หนูขาวพันธุ์ wistar เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 200-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

1.2. หนูตะเภา เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 300-500 กรัม จากฟาร์มผู้เลี้ยง ตำบลบางยี่เรือ อำเภอธนบุรี กรุงเทพมหานคร

2. เครื่องมือ

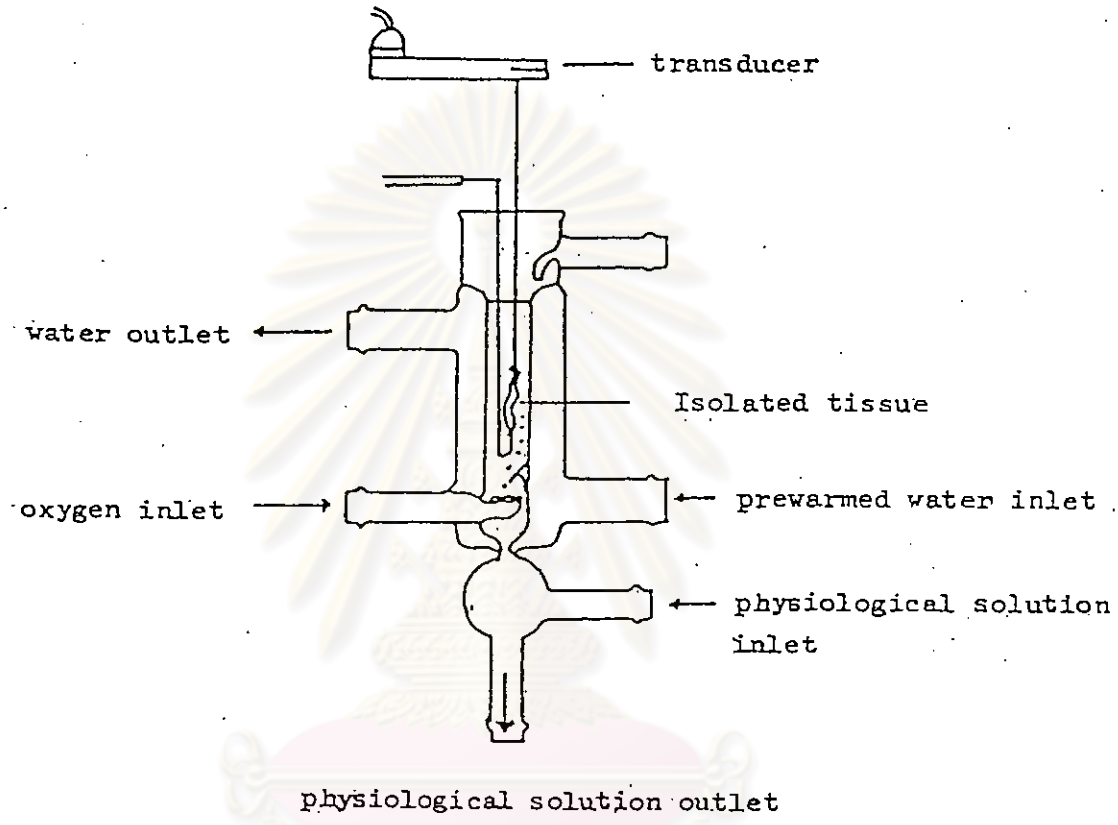
2.1 organ bath แบบ double walled Havard type ประกอบด้วย หลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) มีความจุ 20 มิลลิลิตร และมีช่องเปิดให้อากาศผ่านเข้าได้ ชั้นนอกมีน้ำอุ่นซึ่งส่งมาจาก water bath โดย thermoregulating water pump คอยควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ (รูปภาพที่ 6)

2.2 water bath ชนิด Thermo bath model SCBI พร้อม thermoregulating water pump model 2E-Ny ของบริษัท Little giant pump

2.3 เครื่องมือวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ isometric transducer

2.4 เครื่องบันทึกผลการทดลอง Universal oscillograph ของบริษัท Harvard

2.5 เครื่องบันทึกผลการทดลองพร้อมขยายสัญญาณไฟฟ้า Gilson N2 ของบริษัท Harvard



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปภาพที่ 6 แสดงการจัดเครื่องมือ organ bath สำหรับทดลองกับ isolated organ

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ

acetylcholine chloride (Sigma)

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex (Sigma)

histamine dihydrochloride (Sigma)

tetraethylammonium chloride (Sigma)

barium chloride (Sigma)

calcium chloride (Merck)

3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นสารยับยั้งมาตรฐาน

verapamil hydrochloride (Sigma)

(dl)-isoproterenol (Sigma)

3.3 สารทดลอง

เป็นสารสกัดบริสุทธิ์จากเปลือกต้นของตาเสือทุ่ง (Dysoxylum cyrtobotryum Miq.) โดยเตรียมในรูปสารละลาย โดยใช้น้ำกลั่น 3 ครั้งเป็นตัวทำละลาย

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการทดลองแบบ in vitro กล่าวคือเป็นการทดลองที่แยกเอาเนื้อเยื่อหลอดลมออกมาศึกษานอกตัวสัตว์ทดลองและเนื่องจากเนื้อเยื่อหลอดลมที่แยกจากตัวหนูขาวไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย histamine ในการดำเนินการวิจัยนี้จึงศึกษาผลของ อัลคาลอยด์(R) จากต้นตาเสือทุ่ง (Dysoxylum cyrtobotryum Miq.) ต่อการกระตุ้นด้วย histamine ในเนื้อเยื่อหลอดลมของหนูตะเภา ดังนั้นการทดลองจึงแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาทดลองในหนูขาว ส่วนที่สองเป็นการศึกษาทดลองในหนูตะเภา ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การเตรียมกล้ามเนื้อหลอดลม

ใช้หนูขาวเพศผู้น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม (กรณีของหนูตะเภาใช้เพศผู้น้ำหนักประมาณ 300-500 กรัม) โดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณหัว

018816

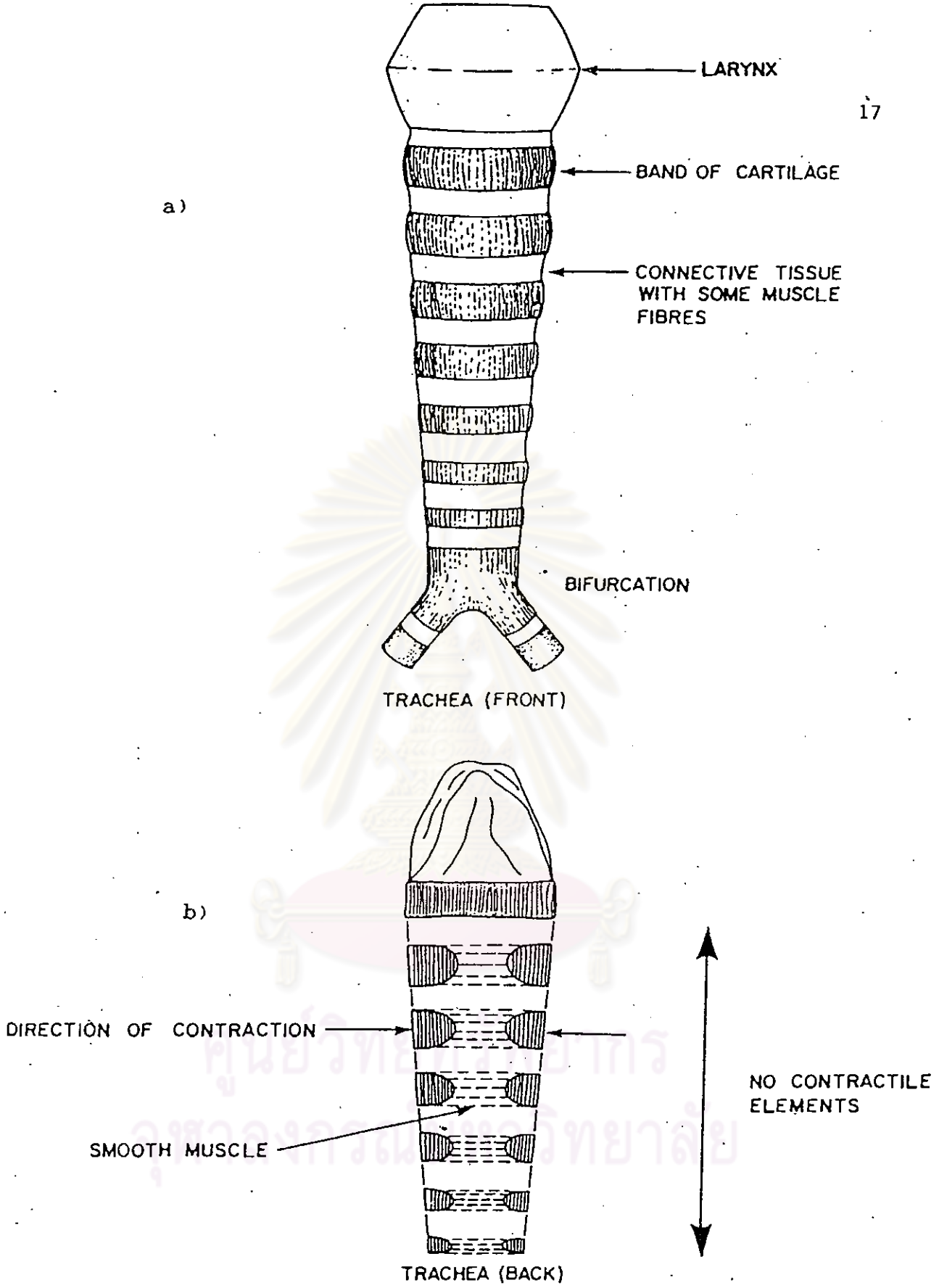
และรีบดึงคอ ผ่าตัดเปิดช่วงคอจนถึงช่องอกแยกตัดเอาหลอดลม โดยตัดให้ต่ำลงมาจากกล่องเสียงประมาณ 5 มิลลิเมตร และตัดให้มีความยาวของหลอดลมประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร รีบแช่หลอดลมที่แยกออกมาในสารละลาย Krebs Henseleit (ตารางที่ 1) ใน petridish ซึ่งมีก๊าซ O_2 95%+CO_2 5% ผ่านอยู่ตลอดเวลาตัดแยกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและหลอดเลือดออกให้หมด แล้วแบ่งครึ่งหลอดลมเป็น 2 ท่อน สามารถใช้ทดลองได้ 2 ครั้ง แล้วจึงเตรียมหลอดลมโดยตัดแบบเกลียว (Blattner et al., 1978) ดังแสดงในรูปภาพที่ 7 และ 8 ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit อยู่ 20 มิลลิลิตร และมีก๊าซ $O_2$95%+$CO_2$5% ผ่านตลอดเวลาอุณหภูมิ 37$\pm$0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล (universal oscillograph) และขยายสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณ Gilson (รูปภาพที่ 6) เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการข้างต้นแล้ว ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 0.5-0.8 กรัม แล้ว equilibrate เนื้อเยื่อประมาณ 60-90 นาที จนกระทั่งกล้ามเนื้อมีความตึงคงที่ จึงเริ่มการทดลองโดยระหว่าง equilibrate เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาที

2. การทดลอง

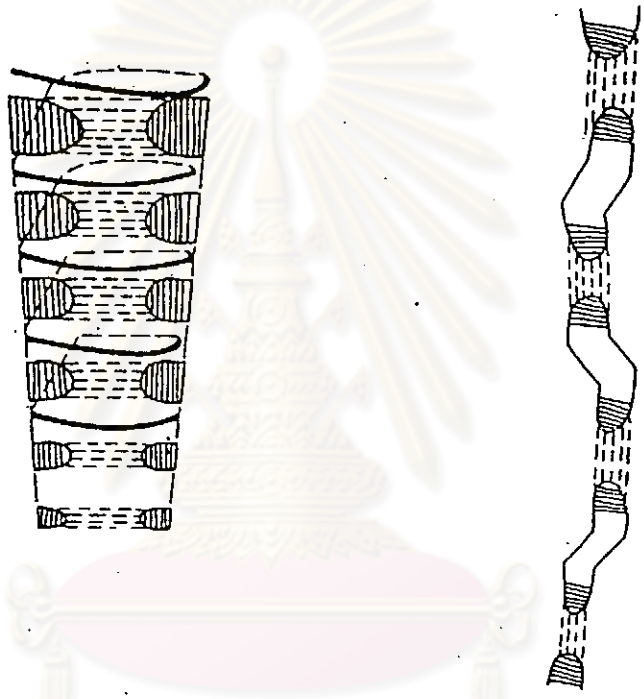
2.1 การทดลองในหนูขาว

2.1.1 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) ต่อ cumulative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของหลอดลม (acetylcholine และ 5-hydroxytryptamine)

เมื่อ equilibrate กล้ามเนื้อจนมีความตึง (tension) คงที่แล้วให้ Ach แบบสะสมขนาด ($1.0x10^{-8}$-$3.0x10^{-4}$ M) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้งแล้ว incubate เนื้อเยื่อ 30 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาที และปรับความตึงของ



รูปภาพที่ 7 แสดงลักษณะด้านหน้าของหลอดลม (a), ด้านหลังและการเรียงตัวของกล้ามเนื้อของหลอดลม (b) ที่แยกจากสัตว์ทดลอง



รูปภาพที่ 8 แสดงการเตรียมหลอดลมโดยการตัดแบบเกลียว (spiral preparation)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มต้นทดลองศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) โดยการให้อัลคาลอยด์ (R) ก่อนประมาณ 10 นาที จึงให้ Ach แบบสะสมขนาด

เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ Ach เมื่อไม่มีอัลคาลอยด์ (R), เมื่อมีอัลคาลอยด์ (R) ขนาด 1.23×10^{-4} M และ 3.68×10^{-4} M และเมื่อมี verapamil 1.0×10^{-6}M หรือ (dl)-isoproterenol 1.0×10^{-6}M

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ cumulative dose-response curve ของ Ach แต่เปลี่ยนมาใช้ 5HT เป็นตัวกระตุ้น เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ 5HT เมื่อไม่มีอัลคาลอยด์ (R), เมื่อมีอัลคาลอยด์(R) ขนาด 1.23×10^{-4} M และ 3.68×10^{-4}M และเมื่อมี verapamil 1.0×10^{-6}M หรือ (dl)-isoproterenol 1.0×10^{-6} M

2.1.2 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์(R) ต่อ cumalative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ใน potassium-depolarizing solution

เตรียมกล้ามเนื้อหลอดลมและ equilibrate ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit (ตารางที่ 1) จนมีความตึงคงที่เปลี่ยนสารละลายเป็น potassium-depolarizing (ตารางที่ 1) และ equilibrate ต่อจนความตึงของกล้ามเนื้อคงที่ ให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด (0.5-10 mM) หลังจากนั้นล้างและคลายกล้ามเนื้อด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit 2-3 ครั้ง equilibrate กล้ามเนื้อให้มีความตึงเท่ากับตอนเริ่มทดลอง ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) โดยการให้อัลคาลอยด์ (R) ก่อนประมาณ 10 นาที จึงให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด

เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ $CaCl_2$ เมื่อไม่มีอัลคาลอยด์ (R), เมื่อมีอัลคาลอยด์ (R) ขนาด 1.23×10^{-4} M และ 3.68×10^{-4} M และเมื่อมี verapamil 1.0×10^{-6} M

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ physiological solution (มิลลิโมล/ลิตร)

	physiological solution		
	Krebs Henseleit	Ca^{2+}-free Krebs Henseleit	potassium depolarizing
NaCl	118.0	118.0	27.0
KCl	4.70	4.70	100.0
$CaCl_2$	2.52	-	-
$MgSO_4$	1.64	1.64	-
$NaHCO_3$	24.88	24.88	14.0
KH_2PO_4	1.18	1.18	-
Glucose	5.55	5.55	10.0
EGTA	-	0.1	-
$MgCl_2$	-	2.52	0.54

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3 ศึกษาผลของ Ca^{2+}-free Krebs Henseleit solution ต่อการหดตัวของหลอดลมเมื่อกระตุ้นด้วย Ach หรือ 5HT

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้ Ach ในขนาดความเข้มข้นเดียว (single dose) เมื่อกล้ามเนื้อหดตัวจนถึงค่าสูงสุด และคงที่ประมาณ 2-3 นาที จึงล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อ 10 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit 2-3 ครั้ง equilibrate และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้มีความตึงเท่ากับตอนเริ่มต้นและคงที่ จากนั้นให้ Ach ขนาดเท่าเดิม

ศึกษาทดลองโดยใช้ตัวกระตุ้นดังนี้ Ach ขนาด $1.0x10^{-6}$ M, $1.0x10^{-5}$ M และ $1.0x10^{-4}$ M และ 5HT ขนาด $1.0x10^{-6}$ M, $1.0x10^{-5}$ M และ $1.0x10^{-4}$ M ตามลำดับ

2.1.4 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์(R) ต่อการหดตัวของหลอดลมที่กระตุ้นโดย $BaCl_2$

ในการทดลองที่ใช้ $BaCl_2$ ขนาดสูงๆ นั้น จะต้องใช้ Tris buffer solution แทน bicarbonate buffer solution และปรับ pH ที่ 7.4 (karaki, Satake. and Shibata, 1986) เพื่อป้องกันการตกตะกอน

2.1.4.1 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) ต่อ cumulative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ใน HCO^-_3-free solution (ตารางที่ 2)

เมื่อ equilibrate กล้ามเนื้อหลอดลมให้คงที่ใน HCO^-_3-free solution แล้วให้ $BaCl_2$ แบบสะสมขนาด (1-30 mM) หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย HCO^-_3-free solution 2-3 ครั้ง equilibrate และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเริ่มต้นและคงที่ประมาณ 30 นาที ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) โดยให้อัลคาลอยด์ (R) ก่อน 10 นาที จึงให้ $BaCl_2$ แบบสะสมขนาด

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของ physiological solution (มิลลิโมล/ลิตร) ที่ใช้กับการทดลองของการให้ $BaCl_2$ ในขนาดสูง

	physiological solution		
	HCO_3^--free	Ca^{2+} and HCO_3^--free	HCO_3^--free-potassium depolarizing
NaCl	136.9	136.9	136.9
KCl	5.4	5.4	60.0
$CaCl_2$	1.5	-	-
$MgCl_2$	1.0	1.0	1.0
$NaHCO_3$	-	-	-
Glucose	5.5	5.5	5.5
Tris	23.8	23.8	23.8
EGTA	-	0.1	0.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างผลของอัลคาลอยด์ (R) ขนาด $1.23x10^{-6}$ M, $3.68x10^{-6}$ M และ verapamil ขนาด $1.0x10^{-6}$ M

2.1.4.2 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) ต่อ cumulative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ใน HCO^-_3free-potassium depolarizing solution (ตารางที่ 2)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4.1 แต่ใช้สารละลาย HCO^-_3-free-potassium depolarizing แทน

2.1.4.3 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์(R) ต่อ cumulative dose response curve เมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ในสารละลาย Ca^{2+} and HCO^-_3-free

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1.1 แต่ใช้สารละลาย Ca^{2+} and HCO^-_3-free แทน

2.2 การทดลองในหนูตะเภา

หลอดลมที่เตรียมจากหนูตะเภานั้นสามารถหดตัวได้เอง (intrinsic tone) ซึ่งถูกยับยั้งแบบผันกลับได้โดยยากลุ่มคลายกล้ามเนื้อเรียบ (Castillo and de Beer, 1947; Foster, 1966) ต่อมาพบว่า prostaglandins อาจจะเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความสามารถในการหดตัวได้เองนี้ เนื่องจากถูกยับยั้งได้ด้วย indomethacin (Farmer, Farrar and Wilson, 1974) และต่อมาพบว่าการหลั่งสาร epithelial derived cyclo-oxygenase product ซึ่งเชื่อว่าคือ PGE_2 จากชั้น epithelium ของหลอดลมเป็นตัวที่ควบคุมการหดตัวนี้และควบคุมการตอบสนองและความไว (sensitivity) ของกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นด้วย histamine ในหลอดลมที่เตรียมจากหนูตะเภา (Braunstein et al., 1988) ดังนั้นในการทดลองต่อไปนี้จะใส่ indomethacin ขนาด $2.8x10^{-6}$ M ใน physiological solution เพื่อยับยั้งผลของ PGE_2 ดังกล่าว

2.2.1 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) ต่อ cumulative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วย histamine

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อหลอดลมและ equilibrate จนมีความตึงคงที่แล้วให้ histamine แบบสะสมขนาด ($1.0x10^{-7}$-$3.0x10^{-4}$ M) เปรียบเทียบกับเมื่อให้อัลคาลอยด์ (R) ขนาด $1.23x10^{-4}$ M หรือ $3.68x10^{-4}$ M ก่อนประมาณ 10 นาที แล้วจึงให้ histamine แบบสะสมขนาด

ทำการทดลองเช่นเดิมแต่ให้ verapamil $1.0x10^{-4}$ M แทนการใช้อัลคาลอยด์ (R)

2.2.2 ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) ต่อการหดตัวของหลอดลมเมื่อกระตุ้นด้วย TEA แบบสะสมขนาด

equilibrate กล้ามเนื้อหลอดลมในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ให้ TEA แบบสะสมขนาด (1-8 mM) หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 30 นาที และระหว่างนี้ปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มทดลองและคงที่ ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ (R) โดยการให้อัลคาลอยด์ (R) ขนาด $3.68x10^{-4}$ M ก่อน 10 นาที จึงให้ TEA แบบสะสมขนาดเปรียบเทียบผลกับเมื่อให้ verapamil ขนาด $1.0x10^{-6}$ M

2.2.3 ศึกษาผลของ TEA ในการต้านฤทธิ์การยับยั้งการหดตัวของหลอดลมโดยอัลคาลอยด์ (R) เมื่อกระตุ้นด้วย histamine, acetylcholine และ $CaCl_2$ ใน potassium-depolarizing solution

equilibrate กล้ามเนื้อหลอดลมในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้ histamine ขนาด $1.0x10^{-5}$ M เมื่อกล้ามเนื้อตอบสนองจนมีการหดตัวสูงสุดและคงที่ให้อัลคาลอยด์ (R) ขนาด $3.68x10^{-4}$ M รอจนกระทั่งกล้ามเนื้อคลายตัวต่ำสุดและคงที่จึงให้ TEA ขนาด 8 mM เปรียบเทียบผลการทดลองเมื่อใช้ verapamil ขนาด $0.5x10^{-4}$M แทนการใช้อัลคาลอยด์ (R)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้นแต่เปลี่ยนตัวกระตุ้นเป็น Ach 1.0×10^{-6} M เปรียบเทียบผล

เปรียบเทียบผลกับเมื่อใช้ $CaCl_2$ 2.5 mM ในสารละลาย potassium depolarizing เป็นตัวกระตุ้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean±standard error of mean) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองและเปรียบเทียบผลของกลุ่มทดลองจากอัลคาลอยด์ (R) กับ verapamil หรือ isoproterenol ใช้ Student's unpaired t-test ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าก่อนและหลังการทดลองใช้ Student's paired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

ใน cumulative dose-response curve จะวัดความตึงตัว (tension) ของกล้ามเนื้อเมื่อได้รับสารกระตุ้นในขนาดต่างๆ แสดงออกมาเป็นร้อยละของการหดตัวสูงสุด (percent of maximum contraction)

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

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

เมื่อ [B] คือความเข้มข้นของ competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

$[A_B]$ และ $[A_0]$ คือความเข้มข้นของ agonist ใน หน่วยโมลาร์ที่ทำให้เกิด 50% response เมื่อมีและไม่มี antagonist ตามลำดับ

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

เมื่อ $[B']$ คือความเข้มข้นของ non-competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

E_{Am} และ E_{AmB}' คือค่าการหดตัวสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้นเมื่อไม่มีและมีสารยับยั้งตัวกระตุ้นอยู่ด้วยตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย