บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

สุกรไม่จำกัดเพศ น้ำหนักประมาณ 90 - 100 กิโลกรัม ซึ่งนำมาฆ่าเพื่อจำหน่ายในโรงฆ่าสัตว์บางแค กรุงเทพมหานคร

2. เครื่องมือ

-organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological solution) มีความจุ 20 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกมาทดลอง และมีช่องเปิดให้อากาศผ่านเข้าได้ ชั้นนอกของ organ bath มีน้ำมาไหลเวียน ซึ่งควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37±0.5 องศาเซลเซียส โดยมี thermoregulating water pump เป็นตัวส่งน้ำมาบริเวณดังกล่าว และทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 6

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

-เครื่องมือวัดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ isometric transducer

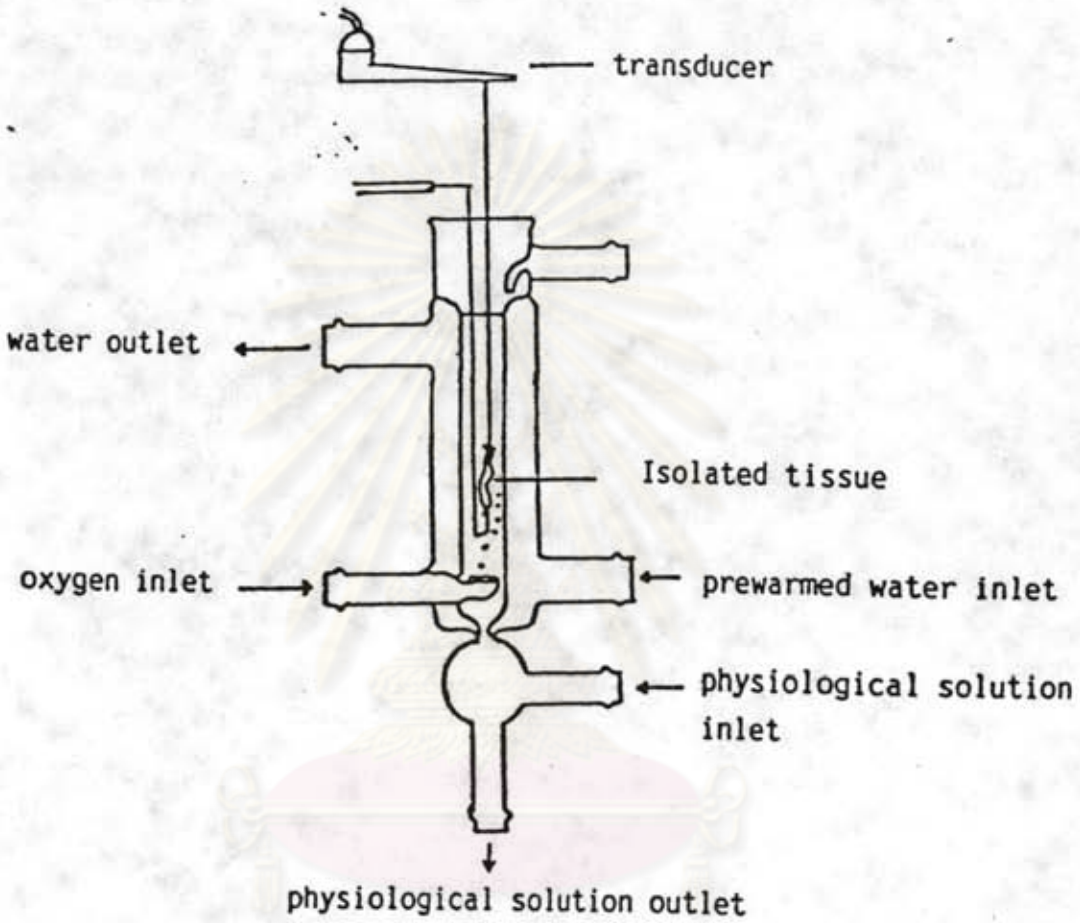
-เครื่องบันทึกผลการทดลอง universal oscillograph ของบริษัท Harvard

-เครื่องบันทึกผลการทดลองพร้อมขยายสัญญาณไฟฟ้า Gilson N2 ของบริษัท Harvard

3. สารเคมี

-สารเคมีที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือด

acetylcholine chloride (Sigma)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 แสดงการจัดเครื่องมือ organ bath สำหรับทดลองกับ isolated organ

serotonin creatinine sulfate (Sigma)

noradrenaline (Sigma)

histamine (Sigma)

barium chloride (May & Baker)

calcium chloride (Sigma)

-สารเคมีที่ใช้เป็นสารยับยั้งมาตรฐาน

verapamil (Sigma)

-สารทดลอง

terfenadine (Siam Pharamaceutical) โดยเตรียมในรูปสารละลาย ใช้ absolute ethanol (E.Merck) เป็นตัวทำละลาย

วิธีดำเนินการวิจัย

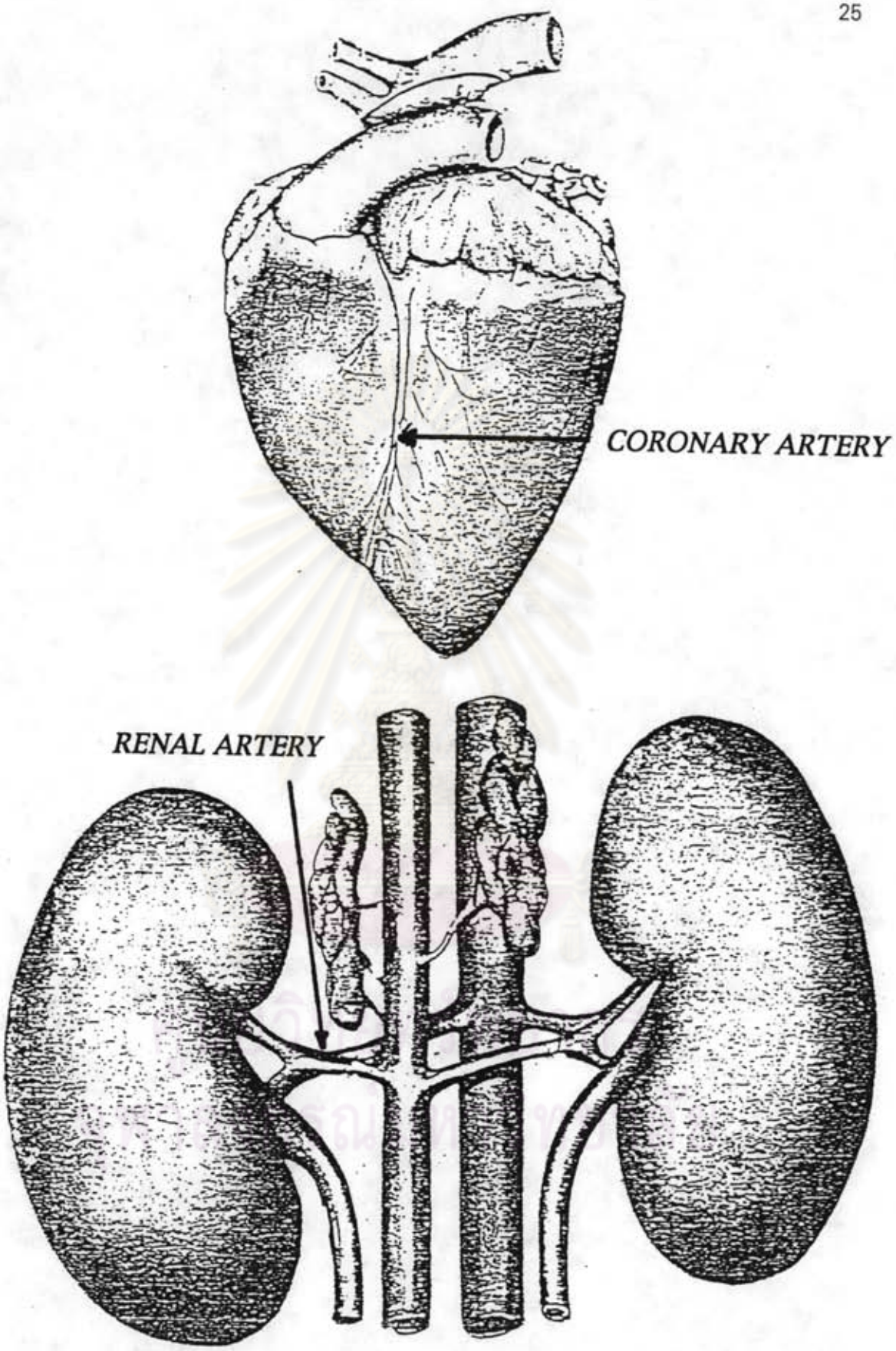
1. การเตรียมหลอดเลือด

การเตรียมหลอดเลือดไต

แยกหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงไต (renal artery) จากสุกรที่ถูกนำมาชำแหละตามกรรมวิธีของโรงฆ่าสัตว์ โดยเลาะเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มไตจนสามารถเห็นหลอดเลือดที่มาเลี้ยงไต ซึ่งแตกแขนงจากหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 7 แล้วทำการเลาะเยื่อบุที่หุ้มหลอดเลือดไตออกให้ได้ความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร ตัดหลอดเลือด แล้วนำมาแช่สารละลาย Krebs-Henseleit (ตารางที่ 5) ที่บรรจุอยู่ใน Erlenmyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านก๊าซ O_2 95% + CO_2 5% นาน 10 นาที pH 7.35-7.45 โดยเก็บในกระติกน้ำแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมหลอดเลือดหัวใจ

เลาะหลอดเลือดหัวใจสุกร ส่วน proximal left anterior descending coronary artery ซึ่งเป็นเส้นเลือดที่แยกออกจากเส้นเลือดแดงใหญ่ (รูปที่ 7) โดยใช้มีดผ่าตัดกรีดบริเวณข้าง ๆ หลอดเลือดหัวใจ แล้วค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดออกจนหมดให้ยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร จากนั้นตัดหลอดเลือดแล้วนำมาแช่ในสาร



รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งของหลอดเลือดแดงที่แยกจากหัวใจและไตของสุกร

ละลาย Krebs-Henseleit ที่บรรจุอยู่ใน Erlenmyer flask ขนาด 250 มิลลิตร ซึ่งผ่านก๊าซ O_2 95% + CO_2 5% นาน 10 นาที pH 7.35-7.45 โดยเก็บในกระติกน้ำแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

การแขวนหลอดเลือดเพื่อทำการทดลอง

นำหลอดเลือดไตหรือหลอดเลือดหัวใจของสุกรที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมงมาแช่ในสารละลาย Krebs-Henseleit ใน petridish ซึ่งผ่านก๊าซ O_2 95% ± CO_2 5% ตลอดเวลา ทำการตัดหลอดเลือด โดยตัวแบบเกรียว [Blattner และคณะ, 1978] ให้ได้เป็นแถบเส้นเลือดยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้าง โดยปลายข้างหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก และนำไปแช่ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37±0.5 องศาเซลเซียส ที่บรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยผ่านก๊าซ$O_2$95%+$CO_2$5%ตลอดการทดลอง ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งผูกติดกับisometric transducer ซึ่งต่อกับเครื่องบันทึกผลการทดลอง universal oscilllograph และขยายสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณ Gilson ดังแสดงในรูปที่ 6 ดึงแถบเส้นเลือดให้มีความตึง ขณะพักประมาณ 0.5-1 กรัม แล้วincubate ประมาณ 90-120 นาที จนกระทั่งแถบเส้นเลือดมีความตึงคงที่จึงเริ่มทำการทดลอง โดยระหว่างการ incubate แถบเส้นเลือดจะเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก ๆ 15 นาที

2. ศึกษาผลของ terfenadine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดไตเมื่อได้รับการ กระตุ้นโดยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวแบบสะสม (cumulative)

เมื่อ incubate แถบเส้นเลือดไตจนมีความตึงคงที่แล้ว ให้ absolute ethanol 20 mcl. หลังจากนั้น 10 นาที ให้ noradrenaline แบบสะสมขนาด 1.0×10^{-9} - 1.0×10^{-4} M จนกระทั่งแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3-5 ครั้ง แล้ว incubate แถบเส้นเลือดประมาณ 30-45 นาที (ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก ๆ 15 นาที) จนกระทั่งมีความตึงเท่ากับเมื่อเริ่มการทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ terfenadine โดย

ให้ terfenadine ก่อน 10 นาที จึงให้ noradrenaline แบบสะสมขนาด $1.0x10^{-9}$ - $1.0x10^{-4}$ M บันทึกผลเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ noradrenaline เมื่อไม่มี terfenadine กับเมื่อมี terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M และ $4x10^{-5}$ M

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย standard physiological ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสารละลายที่ใช้ องค์ประกอบ (mM)	Krebs-Henseleit	Ca^{2+}-free KHS	high K^+-depolarizig	Ca^{2+} and HCO_3^- free
sodium chloride	118.0	118.0	27.0	136.9
potassium chloride	4.7	4.7	100.0	5.4
magnesium chloride	-	2.52	0.54	1.0
magnesium sulfate	1.64	1.64	-	-
calcium chloride	2.52	-	-	-
sodium bicarbonate	24.88	24.88	14.00	-
potassium dibasic phosphate	1.18	1.18	-	-
glucose	11.10	11.10	11.10	11.10
EGTA	-	0.10	-	0.10
Tris buffer	-	-	-	23.8
purified water qs.	1 lt.	1 lt.	1 lt.	1 lt.

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ cumulative dose-response curve ของ noradrenaline แต่เปลี่ยนมาให้ serotonin (5-HT) และ histamine แบบสะสมขนาด $1.0x10^{-8}$ - $1.0x10^{-4}$ M และ $1.0x10^{-7}$ - $1.0x10^{-2}$ M ตามลำดับ และในกรณีของ histamine จะให้ terfenadine ก่อน 60 นาที ในกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง

cumulative dose-response curve ของ serotonin และ histamine เมื่อไม่มี terfenadine กับเมื่อมี terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M และ $4x10^{-5}$ M

3. ศึกษาผลของ terfenadine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจเมื่อได้รับการกระตุ้นโดยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวแบบสะสม

เมื่อ incubate แถบเส้นเลือดหัวใจจนมีความตึงคงที่แล้ว ให้ absolute ethanol 20 mcl. หลังจากนั้น 10 นาที ให้ acetylcholine (Ach) แบบสะสมขนาด $1.0x10^{-8}$ - $1.0x10^{-4}$ M จนกระทั่งแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3-5 ครั้ง แล้ว incubate แถบเส้นเลือดประมาณ 30-45 นาที (ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก ๆ 15 นาที) จนกระทั่งมีความตึงเท่ากับเมื่อเริ่มการทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ terfenadine โดยให้ terfenadine ก่อน 10 นาที จึงให้ acetylcholine แบบสะสมขนาด $1.0x10^{-8}$ - $1.0x10^{-4}$ M บันทึกผลเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ acetylcholine เมื่อไม่มี terfenadine กับเมื่อมี terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M และ $4x10^{-5}$ M

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ cumulative dose-response curve ของ acetylcholine แต่เปลี่ยนมาให้ serotonin และ histamine แบบสะสมขนาด $1.0x10^{-8}$ - $1.0x10^{-4}$ M และ $1.0x10^{-7}$ -$1.0x10^{-2}$ M ตามลำดับ และในกรณีของ histamine จะให้ terfenadine ก่อน 60 นาที ในกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ serotonin และ histamine เมื่อไม่มี terfenadine กับเมื่อมี terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M และ $4x10^{-5}$ M

4. ศึกษาผลของ terfenadine ในการต้านการหดตัวของหลอดเลือดไต เมื่อกระตุ้นด้วย calcium chloride ($CaCl_2$) ในสารละลาย potassium depolarizing

เมื่อ incubate แถบเส้นเลือดไตในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit (ตารางที่ 5) จนมีความตึงคงที่แล้ว เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย potassium depolarizing (ตารางที่ 5) และ incubate ต่อจนมีความตึงคงที่ จึงให้ absolute ethanol 20 mcl. หลังจากนั้น 10 นาที ให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด 2, 4, 6, 8, 10 mM ตามลำดับ จนแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่จึงเปลี่ยนเป็นสารละลาย potassium depolarizing incubate จนกระทั่งมีความตึงคงที่ จึงทำการศึกษาผลของ terfenadine โดยให้ terfenadine $2x10^{-5}$ M ก่อน 10 นาที หลังจากนั้นให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด 2, 4, 6, 8, 10 mM ตามลำดับ บันทึกผลเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ $CaCl_2$ เมื่อไม่มี terfenadine, เมื่อมี terfenadine ขนาด $2.0x10^{-5}$ M, และเมื่อมี verapamil $1.0 x10^{-6}$ M

5. ศึกษาผลของ terfenadine ในการต้านการหดตัวของ หลอดเลือด หัวใจ เมื่อกระตุ้นด้วย calcium chloride ในสารละลาย potassium depolarizing

เมื่อ incubate แถบเส้นเลือดหัวใจในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่แล้ว เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย potassium depolarizing และincubate ต่อจนมีความตึงคงที่ จึงให้ absolute ethanol 20 mcl. หลังจากนั้น 10 นาที ให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด 0.5, 1, 2, 4, 8 mM ตามลำดับ จนแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่จึงเปลี่ยนเป็นสารละลาย potassium depolarizing incubate จนกระทั่งมีความตึงคงที่ จึงทำการศึกษาผลของ

terfenadine โดยให้ terfenadine $2x10^{-5}$ M ก่อน 10 นาที หลังจากนั้นให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด 0.5, 1, 2, 4, 8 mM ตามลำดับ บันทึกผลเป็นกลุ่มทดลองเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ $CaCl_2$ เมื่อไม่มี terfenadine, เมื่อมี terfenadine ขนาด $2.0x10^{-5}$ M, และเมื่อมี verapamil $1.0x10^{-6}$ M

6. ศึกษาผลของ terfenadine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดไต เมื่อกระตุ้นด้วย barium chloride ในสารละลาย Ca^{2+}, HCO_3^- - free Krebs Henseleit

เมื่อ incubate แถบเส้นเลือดไตในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่แล้วเปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}, HCO_3^- - free Krebs Henseleit (ตารางที่ 5) แล้ว incubate ต่อจนแถบเส้นเลือดมีความตึงคงที่ จึงให้ absolute ethanol 20 mcl. ก่อน 10 นาที หลังจากนั้นให้ barium chloride ($BaCl_2$) แบบสะสมขนาด $1x10^{-4}$, $2x10^{-4}$, $4x10^{-4}$, $6x10^{-4}$, $8x10^{-4}$ และ $10x10^{-4}$ M ตามลำดับ จนแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มควบคุม-1 หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit และ incubate ต่อประมาณ 45 นาที จึงเปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}, HCO_3^- - free Krebs Henseleit จนแถบเส้นเลือดมีความตึงเท่ากับเมื่อเริ่มทดลอง แล้วทำการทดลองซ้ำในลักษณะเดียวกันกับกลุ่มควบคุม-1 บันทึกผลการทดลองที่ได้เป็นกลุ่มควบคุม-2 จากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseliet และ incubate ต่อประมาณ 45 นาที จึงเปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}, HCO_3^- - free Krebs Henseleit จนแถบเส้นเลือดมีความตึงเท่ากับเมื่อเริ่มทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ terfenadine โดยให้ terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M ก่อน 10 นาที หลังจากนั้นให้ $BaCl_2$ แบบสะสมขนาด $1x10^{-4}$, $2x10^{-4}$, $4x10^{-4}$, $6x10^{-4}$, $8x10^{-4}$, และ $10x10^{-4}$ M ตามลำดับ บันทึกผลเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ $BaCl_2$ เมื่อไม่มี terfenadine กับเมื่อมี terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M

7. ศึกษาผลของ terfenadine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจเมื่อกระตุ้นด้วย barium chloride ในสารละลาย Ca^{2+}, HCO_3^- - free Krebs Henseleit

เมื่อ incubate แถบเส้นเลือดหัวใจในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่แล้วเปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}, HCO_3^- - free Krebs Henseleit แล้ว incubate ต่อจนแถบเส้นเลือดมีความตึงคงที่ จึงให้ absolute ethanol 20 mcl. ก่อน 10 นาที หลังจากนั้นให้ $BaCl_2$ แบบสะสมขนาด $1x10^{-4}$, $2x10^{-4}$, $4x10^{-4}$, $6x10^{-4}$, $8x10^{-4}$, และ $10x10^{-4}$ ตามลำดับ จนแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มควบคุม-1 หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleitและ incubate ต่อประมาณ 45 นาที จึงเปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}, HCO_3^- - free Krebs Henseleit จนแถบเส้นเลือดมีความตึงเท่ากับเมื่อเริ่มทดลอง แล้วทำการทดลองซ้ำในลักษณะเดียวกันกับกลุ่มควบคุม-1 บันทึกผลการทดลองที่ได้เป็นกลุ่มควบคุม-2 จากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseliet และ incubate ต่อประมาณ 45 นาที จึงเปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}, HCO_3^- - free Krebs Henseleit จนแถบเส้นเลือดมีความตึงเท่ากับเมื่อเริ่มทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ terfenadine โดยให้ terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M ก่อน 10 นาที หลังจากนั้นให้ $BaCl_2$ แบบสะสมขนาด $1x10^{-4}$, $2x10^{-4}$, $4x10^{-4}$, $6x10^{-4}$, $8x10^{-4}$, และ $10x10^{-4}$ ตามลำดับ บันทึกผลเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ $BaCl_2$ เมื่อไม่มี terfenadine กับเมื่อมี terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M

8. ศึกษาผลของ terfenadine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดไต เมื่อได้รับการชักนำให้หดตัวด้วย potassium chloride ในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit

incubate แถบเส้นเลือดไตในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit จนแถบเส้นเลือดมีความตึงขณะพักคงที่ จึงให้ absolute ethanol ก่อน 10 นาที หลัง

จากนั้น ให้สารละลาย potassium chloride (KCl) เข้มข้น 100 mM จนแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit 4-5 ครั้ง incubate จนแถบเส้นเลือดมีความตึงคงที่ จึงศึกษาผลของ terfenadine โดยให้ terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M ก่อน 10 นาที หลังจากนั้น ให้สารละลาย KCl เข้มข้น 100 mM จนแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุม กับกลุ่มทดลองที่ได้รับ terfenadine

9. ศึกษาผลของ terfenadine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจเมื่อได้รับการชักนำให้หดตัวด้วย potassium chloride ในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit

incubate แถบเส้นเลือดหัวใจในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit จนแถบเส้นเลือดมีความตึงขณะพักคงที่ จึงให้ absolute ethanol ก่อน 10 นาที หลังจากนั้น ให้สารละลาย KCl เข้มข้น 100 mM จนแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs Henseleit 4-5 ครั้ง incubate จนแถบเส้นเลือดมีความตึงคงที่ จึงศึกษาผลของ terfenadine โดยให้ terfenadine ขนาด $2x10^{-5}$ M ก่อน 10 นาที หลังจากนั้น ให้สารละลาย KCl เข้มข้น 100 mM จนแถบเส้นเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุม กับกลุ่มทดลองที่ได้รับ terfenadine

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of mean) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทำโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับ terfenadine ขนาด

$2x10^{-5}$ และ/หรือ $4x10^{-5}$ M ใช้สถิติ one way analysis of variance และ/หรือ Student's pair t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ใน cumulative dose-response curve จะแสดงผลการหดตัวของแถบเส้นเลือด เมื่อได้รับสารกระตุ้นในขนาดต่าง ๆ เป็นร้อยละของการหดตัวสูงสุด (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

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

เมื่อ [B] คือ ความเข้มข้นของ competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

$[A_B]$ และ $[A_O]$ คือความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิด 50% response เมื่อมีและไม่มี antagonist ตามลำดับ

$$pD'_2 = -\log[B'] + \log(E_{AM}/E_{AMB'} - 1)$$

เมื่อ E_{AM} และ $E_{AMB'}$ คือค่าการหดตัวสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้นเมื่อไม่มีและมีสารยับยั้งตัวกระตุ้นอยู่ด้วยตามลำดับ

[B'] คือความเข้มข้นของ non-competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์