บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ สารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว (wistar rat) เพศผู้น้ำหนัก 200 - 300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

2. เครื่องมือ

2.1 ใช้ organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในใช้บรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological salt solution) ซึ่งมีความจุประมาณ 25 มิลลิลิตร ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ซึ่งจะส่งให้น้ำไหลเข้าออกหลอดแก้วชั้นนอกอย่างสม่ำเสมอ และ organ bath นี้มีช่องทางเปิดให้ก๊าซไหลผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นในได้ (รูปที่ 2.1)

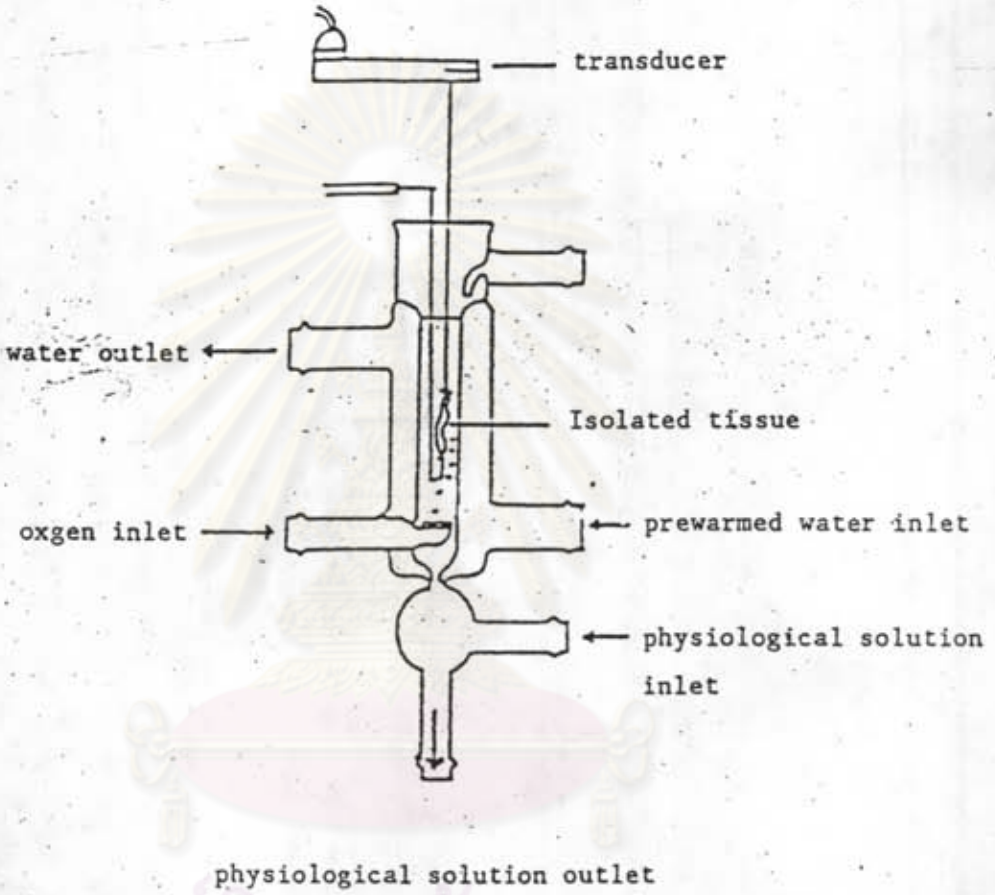
2.2 ชุด isolated organ bath ของบริษัท C.P. Palmer, thermoregulating water pump Churchill type ที่ทำเองในประเทศไทย ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส

2.3 เครื่องมือวัดแรงหดเกร็ง isotonic isometric และ pressure transducer ของบริษัท Washington transducer

ตารางที่ 2.1 Physiological salt solutions composition in mM

	Kreb-Henseleit bicarbonate(KHB)	Ringer-Locke	Potassium-depolarizing
NaCl	115.0	154.0	27.0
KCl	4.7	5.6	100.0
$CaCl_2$	2.5	7.9	-
$MgCl_2$	1.2	-	0.54
KH_2PO_4	1.2	-	-
$NaHCO_3$	25.0	0.6	14.0
Glucose	10.0	5.5	10.0
Aerating gas	95% O_2+5%CO_2	O_2	95%O_2 + 5% CO_2

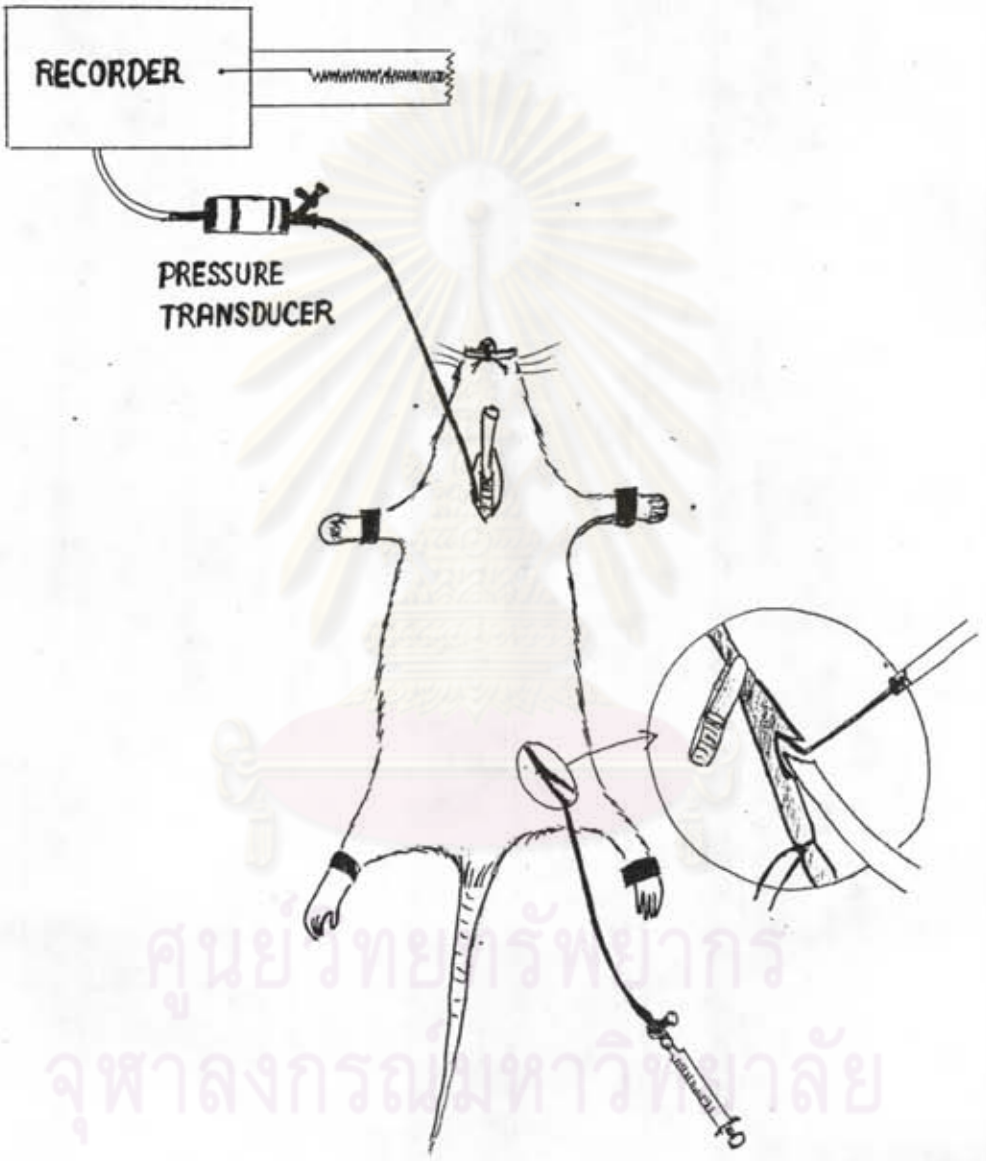
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 Organ bath

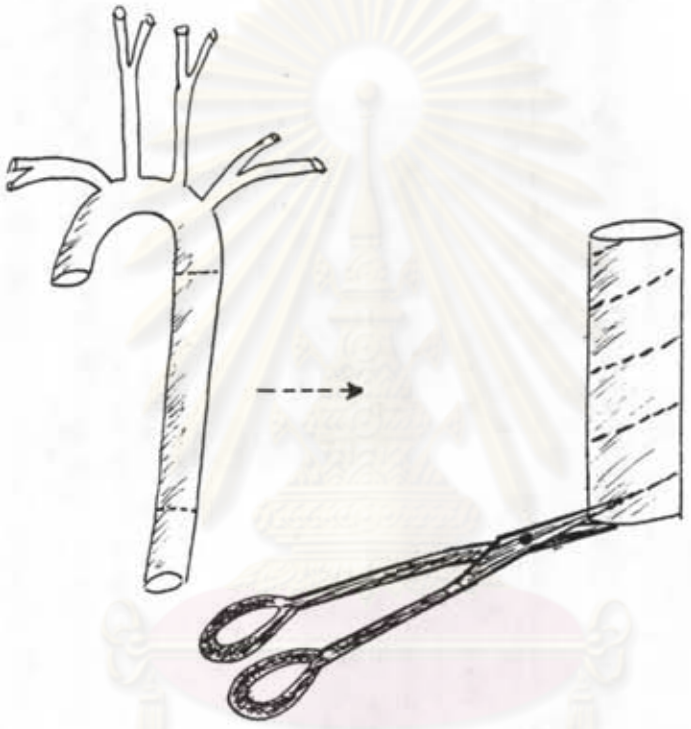
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018669



รูปที่ 2.2 ลักษณะหนูที่ถูกทำให้สลบ แสดงการ canulate femoral vein

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 แสดงวิธีการตัดหลอดเลือด aorta

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 เครื่องบันทึกผลการทดลอง poly graph recorder ของบริษัท Washington 400 M.D. 2C oscillograph และ Universal oscillograph

2.5 เครื่องกระตุ้นกระแสไฟฟ้าให้กับกล้ามเนื้อหัวใจ stimulator S 101 A.

2.6 เครื่องขยายผลการทดลอง Gilson Recorder N 2

3. สารเคมี และก๊าซ

3.1. สารสกัดบริสุทธิ์จากเปลือก และใบของต้นดาเสือกู่ง (Dysoxylum cyrtobotryum) โดย ดร. เอกรินทร์ สายฟ้า ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2. Phynylephrine hydrochloride (Sigma)

3.3. Acetylcholine chloride (Sigma)

3.4. Verapamil hydrochloride (Isoptin®)

3.5. Calcium chloride (Merck)

3.6. Pure oxygen และ Carbogen (95% oxygen + 5 % carbondioxide) ของบริษัท ไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด

3.7. สารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ physiological salt solutions ดังแสดงในตารางที่ 2.1

3.8. Indomethacin (sigma)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาในตัวสัตว์ทดลอง (in vivo)

การศึกษาผลของสารสกัดบริสุทธิ์จาก Dysoxylum cyrtobotryum (R.) ต่อความดันโลหิตในหนูขาวที่สลบ

ในการศึกษาผลต่อความดันโลหิต โดยทำให้หนูขาวสลบด้วย urethane ขนาด 1.4 กรัม ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) เมื่อหนูสลบแล้วผ่าตัด canulate หลอดลมด้วยท่อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เพื่อเปิดทางเดินหายใจให้โล่ง และหนูสามารถหายใจได้ด้วยตัวเอง ผ่าตัด canulate common carotid artery ด้วย polyethylene tube โดยต่อกับ pressure transducer ที่มี hyparinized saline (heparin 1000 iu/0.9% NaCl 50 มิลลิลิตร) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และต่อ pressure transducer กับ เครื่องบันทึกความดันโลหิต ผ่าตัด canulate femoral vein ด้วย polyethylene tube ซึ่ง fill ด้วย heparinized saline ต่อกับ three ways stop clock สำหรับฉีดยาเข้าทางหลอดเลือดดำ จากนั้นรอให้ความดันโลหิตของหนูขาวคงที่อย่างน้อย 45 นาทีก่อนเริ่มการทดลอง (รูปที่ 2.2) บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตในหนูขาวที่สลบเมื่อฉีด normal saline เข้าทางหลอดเลือดดำ เปรียบเทียบกับการให้ สารสกัดบริสุทธิ์ R. ขนาด 0.05, 0.20 และ 0.50 มิลลิกรัม ต่อหนูหนึ่งตัว โดยบันทึกผลต่อความดันโลหิตเป็นเวลา 10 นาทีหลังฉีดสารสกัดบริสุทธิ์ R. เข้าทางหลอดเลือดดำ

2. การศึกษานอกตัวสัตว์ทดลอง (in vitro)

2.1 การศึกษาผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาที่แยกจากกาย

ในการศึกษานี้ใช้หนูขาวเพศผู้ ฆ่าหนูโดยการตีท้ายทอย และผ่าอกอย่างเร็ว ใช้กรรไกรตัดบริเวณคอห้อยหัวลงเพื่อให้เลือดไหลออกจากร่างกายให้มากที่สุดเพื่อป้องกันการเกิดลิ่มเลือดคั่งค้างในกล้ามเนื้อหัวใจ จากนั้นผ่าตัดเปิดหน้าอกแยกเอาหัวใจใส่ใน Ringer-Locke solution ที่มีก๊าซออกซิเจนไหลผ่านตลอด (ส่วนประกอบของสารละลายแสดงในตารางที่ 2.1)

ตัดแยกหัวใจห้องบนขวา (right atrium) และหัวใจห้องบนซ้าย (left atrium) ออกจากกันในการศึกษาผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจใช้หัวใจห้องบนขวา ซึ่งมี SA node เป็นตัวส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังกล้ามเนื้อหัวใจส่วนอื่น ผูกกล้ามเนื้อหัวใจในทิศทางตรงกันข้ามกับการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ โดยปลายด้านหนึ่งผูกกับแผ่นพลาสติก ซึ่งยึดติดกับ organ bath ภายในหลอดแก้วชั้นในบรรจุ Ringer-Locke solution 20 มิลลิลิตร มีก๊าซออกซิเจนไหลผ่านตลอดควบคุมอุณหภูมิของเนื้อเยื่อโดยน้ำที่ไหลผ่านกระบอกแก้วชั้นนอกให้มีอุณหภูมิคงที่ 37องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งของหัวใจห้องบนขวาผูกกับ isometric transducer ต่อกับเครื่องบันทึกผล (รูปที่ 2.1) และปรับให้มีแรงดึงต่อกล้ามเนื้อหัวใจ 0.5 กรัม จากนั้น incubate นาน 30-45 นาที และเปลี่ยน Ringer-Locke solution ทุก 10 นาที

เมื่อ incubate จนกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวาเต้นสม่ำเสมอ และคงที่ บันทึกอัตราการเต้นของหัวใจที่เวลา 1, 3, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ เป็นตัวควบคุม จากนั้นให้สารสกัดบริสุทธิ์ R. ขนาด 8.2 X 10^{-6} M วัดอัตราการเต้นของหัวใจหลังให้ยา 1, 3, 5, และ 10 นาที และให้สารสกัดบริสุทธิ์ R. ขนาด 3.3 X 10^{-5} และ 8.2 X 10^{-5} M เป็น cumulative dose และวัดอัตราการเต้นของหัวใจหลังให้ยาแต่ละขนาด 1, 3, 5 และ 10 นาทีตามลำดับ

2.2 การศึกษาผลต่อแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่แยกจากกาย

ในการศึกษาผลของสารสกัดบริสุทธิ์ R. ต่อแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย ให้หัวใจห้องบนซ้ายซึ่งได้จากการเตรียมเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.1 โดยปลายด้านหนึ่งของกล้ามเนื้อหัวใจเกี่ยวกับขั้วนำไฟฟ้า ซึ่งยึดติดกับ organ bath ที่มี Ringer-Locke solution 20 มิลลิลิตร มีก๊าซออกซิเจนไหลผ่านตลอด ควบคุมอุณหภูมิของเนื้อเยื่อโดยน้ำที่ไหลผ่านกระบอกแก้วชั้นนอกให้มีอุณหภูมิคงที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อผูกกับ isometric transducer ต่อกับเครื่องบันทึกผล (รูปที่ 2.3) และปรับให้มีแรงดึงต่อกล้ามเนื้อหัวใจ 0.5 กรัม

ใช้เครื่องกระตุ้นกระแสไฟฟ้าให้กับกล้ามเนื้อหัวใจ เพื่อให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายในอัตราคงที่ โดยใช้ความถี่ของการกระตุ้น 150 ครั้งต่อนาที, ความแรงของการกระตุ้น 5 - 6 โวลต์, duration 1 มิลลิวินาที จากนั้น inclubate ไว้ 30 - 45 นาที และเปลี่ยน Ringer-Locke solution ทุก 10 นาที

เมื่อ incubate จนกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายเต้นคงที่ วัดแรงบีบตัวของหัวใจก่อนให้สารสกัดบริสุทธิ์ R. เปรียบเทียบกับแรงบีบตัวของหัวใจในนาทีที่ 1, 3, 5 และ 10 หลังให้สารสกัดบริสุทธิ์ R. ขนาด 8.2×10^{-6} , 3.2×10^{-5}, และ 8.2×10^{-5} M เป็น cumulative dose ตามลำดับ

2.3 การศึกษาผลต่อความสามารถในการนำกระแสไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจ

การศึกษาผลของสารสกัดบริสุทธิ์ R. ต่อความสามารถในการนำกระแสไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจใช้หัวใจห้องบนซ้ายที่แยกจากกาย โดยการเตรียมจากวิธีการเช่นเดียวกับ 2.1 และ 2.2

ใช้เครื่องกระตุ้นกระแสไฟฟ้าให้กับกล้ามเนื้อหัวใจ เพื่อให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้าย โดยใช้ความแรงของการกระตุ้น 5 - 6 โวลต์, duration 1 มิลลิวินาที ความถี่ของการกระตุ้น 250 ครั้งต่อนาที กระตุ้นให้คงที่นาน 30 นาที จากนั้นเพิ่มความถี่ของการกระตุ้นช่วงละ 3 นาที โดยเพิ่มความถี่ช่วงละ 50 ครั้งต่อนาทีได้แก่ 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 เป็นต้น จนกระทั่งเกิดการเต้นผิดจังหวะ (arrhythmia) จึงหยุดกระตุ้นเป็นกลุ่มควบคุม ล้างชิ้นเนื้อหลายครั้งด้วย Ringer-Locke solution และ incubate นาน 60 นาที เป็นอย่างน้อย

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ R. ขนาด 1.6×10^{-4} M โดยที่เพิ่มความถี่ของการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าหลังให้สารสกัดบริสุทธิ์ R. 10 นาที เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม บันทึกความถี่ที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการเต้นผิดจังหวะของหัวใจ จึงหยุดกระตุ้น เปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุม

2.4 การศึกษาผลต่อการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวที่แยกจากกาย

ในการศึกษาผลของสารสกัดบริสุทธิ์ R. ต่อการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวที่แยกจากกาย ใช้หลอดเลือดแดงใหญ่ aorta ซึ่งเตรียมม่าหนูโดยการตัดบริเวณท้ายทอย และคิงคอ จากนั้นรีบตัดบริเวณคอเพื่อให้เลือดไหลออกโดยเร็วให้มากที่สุดเพื่อป้องกันเลือดตั้งในหลอดเลือด ผ่าตัดเปิดหน้าอกแยกเอาส่วนหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ใกล้หัวใจ หรือ thoracic aorta ซึ่งยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ใส่ใน petridisk ซึ่งมี Kreb

Henseleit bicarbonate solution โดยมีก๊าซ carbogen (95% oxygen, 5% carbondioxide) ไหลผ่านตลอด เมื่อล้างเลือดที่ติดมากับหลอดเลือดออกหมดแล้ว ค่อย ๆ เฉาะเนื้อรอบ ๆ หลอดเลือด ออกให้หมด จากนั้นตัดหลอดเลือดให้เป็นรูปเกลียว ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ให้มีความกว้างประมาณ 2 มิลลิเมตร ยาว 2 - 2.5 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกด้านหนึ่งของหลอดเลือดที่ตัดเรียบร้อยแล้ว ติดกับแผ่นพลาสติก ซึ่งยึดติดกับ organ bath ซึ่งหลอดแก้วชั้นในบรรจุ Kreb-Henseleit bicarbonate solution 20 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายโดยน้ำที่ไหลผ่านหลอดแก้วชั้นนอกโดยมีอุณหภูมิคงที่ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซ carbogen ไหลผ่านตลอด ปลายอีกด้านหนึ่งของหลอดเลือดผูกกับ isometric transducer ซึ่งต่อกับ recorder เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยตามวิธีการข้างต้น ปรับให้หลอดเลือดมีแรงดึง 0.5 กรัม จากนั้น incubate เป็นเวลา 45 - 60 นาทีก่อนเริ่มการทดลองโดยขณะ incubate เปลี่ยนสารละลาย Kreb-Henseleit bicarbonate ทุก 10 นาที

ในการทดลองใช้ phenylephrine 1 X 10^{-6} M (alpha -1-adrenoceptor agonist) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดสูงสุด เมื่อหลอดเลือดเกิดการหดตัวสูงสุดจนกระทั่งคงที่ในระดับหนึ่งให้สารสกัดบริสุทธิ์ R. 1.6 X 10^{-4} M บันทึกผลของสารสกัดบริสุทธิ์ R ในการคลายตัวของหลอดเลือด

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ R. ในการคลายตัวของหลอดเลือดว่ามีความสัมพันธ์กับ endothelium หรือไม่นั้น ใช้หลอดเลือดชิ้นเดิมนำมาขูด endothelium โดยใช้ cotton bud ขูดเบา ๆ ด้านในของหลอดเลือด และใช้ acetylcholine ซึ่งเป็น endothelium dependent vasodilator เป็นตัวทดสอบว่าไม่มี endothelium แล้วจึงทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ R. ต่อการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายเมื่อไม่มี endothelium

นอกจากนี้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ R. เมื่อ preincubate ด้วย indomethacin ขนาด 2 X 10^{-5} M เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการกระตุ้นด้วย phenylephrine

2.5 การศึกษาผลต่อการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่กระตุ้นด้วย calcium chloride

ในการศึกษาผลของสารสกัดบริสุทธิ์ R. ต่อการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายซึ่งถูกกระตุ้นด้วย calcium chloride ใช้ thoracic aorta และเตรียมเนื้อเยื่อโดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4 ข้างต้น เมื่อ incubate หลอดเลือดจนคงที่แล้ว เปลี่ยนสารละลายในหลอดแก้วชั้นในจาก Kreb-Henseleit bicarbonate solution เป็น Potassium depolarizing tyrode solution 20 มิลลิลิตรซึ่งพบว่าจะทำให้เกิดการหดเกร็งของหลอดเลือดระดับหนึ่ง และค่อย ๆ คลายตัวลงมาจนถึงระดับก่อนเปลี่ยนสารละลายขณะที่รอให้หลอดเลือดคลายตัวให้เปลี่ยนสารละลาย Potassium depolarizing tyrode ทุก 10 นาที จากนั้น incubate 45 - 60 นาทีจนคงที่ก่อนเริ่มการทดลอง

เมื่อ incubate หลอดเลือดจนคงที่ดีแล้ว กระตุ้นให้หลอดเลือดหดเกร็งโดยให้ calcium chloride ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 20 mM เป็น cumulative dose ตามลำดับเพื่อให้เกิดการหดเกร็งของหลอดเลือดสูงสุด

จากนั้นล้างชิ้นเนื้อเยื่อหลอดเลือดด้วย Kreb-Henseleit bicabonate solution ทุก 10 นาที จนหลอดเลือดคลายตัวเต็มที่ จากนั้นเปลี่ยนสารละลายเป็น Potassium depolarizing tyrode solution และ incubate ให้คงที่เช่นวิธีการข้างต้น

ให้สารสกัดบริสุทธิ์ R. พบว่าหลอดเลือดจะคลายตัวลงอีกเล็กน้อย และคงที่ในระดับหนึ่งจึงให้ calcium chloride ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 20 mM ตามลำดับวัดการหดเกร็งของหลอดเลือดหลังให้ calcium chloride แต่ละ dose เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยสารสกัดบริสุทธิ์ R. ที่ใช้ทดสอบ 3 ความเข้มข้น คือ 8.2×10^{-5}, 1.6×10^{-4} และ 3.3×10^{-4} M เปรียบเทียบผลกับ Verapamil 1×10^{-6} M

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of the means)

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมใช้ Student's paired t-test ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล 2 ชุดใช้ Student's unpaired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) และ 99% ($p < 0.01$)

การคำนวณค่า drug 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) ในหน่วยโมลาร์ที่ทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของตัวกระตุ้น (agonist) เป็นสองเท่า จึงจะได้การตอบสนองเท่าเดิม

pA_2 คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$pA_2 = -\log [B] + \log ([A_b]/[A_o]-1)$$

[B] คือ ความเข้มข้นของ Competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์ (Molar)

$[A_b]$ คือ ความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิดการกระตุ้น 50 เปอร์เซนต์ เมื่อมี antagonist (B) อยู่ด้วย

$[A_o]$ คือ ความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิดการกระตุ้น 50 เปอร์เซนต์ เมื่อไม่มี antagonist อยู่

2. ค่า Logarithm ของ affinity ของ Non-competitive antagonist

แสดงในรูป pD'_2 ซึ่งคือค่าของ negative logarithm ของความเข้มข้นของสารยับยั้งตัวกระตุ้น ชนิดไม่แย่งจับที่ตัวสัมผัสรับเดียวกัน (Non-competitive antoganist) ในหน่วยโมลาร์ ซึ่งทำให้การตอบสนองสูงสุด (maximum reponse) ที่เกิดจากตัวกระตุ้น (agonist) ลดลง 50 เปอร์เซนต์

pD'_2 คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

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

$[B']$ คือ ความเข้มข้นของ Non-competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

E_{Am} คือ ค่าการหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้น เมื่อไม่มีสารยับยั้ง (Non-competitive antagonist)

E_{AmB}' คือ ค่าการหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้นเมื่อมีสารยับยั้งอยู่ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย