บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง, เครื่องมือ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

สุกรไม่จำกัดเพศ, อายุ น้ำหนักประมาณ 90-100 กิโลกรัม ซึ่งนำมาฆ่าเพื่อจำหน่ายจากโรงฆ่าสัตว์ บริษัทสามัคคีฟาร์ม จำกัด กล้วยน้ำไท คลองเตย กรุงเทพฯ

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัย

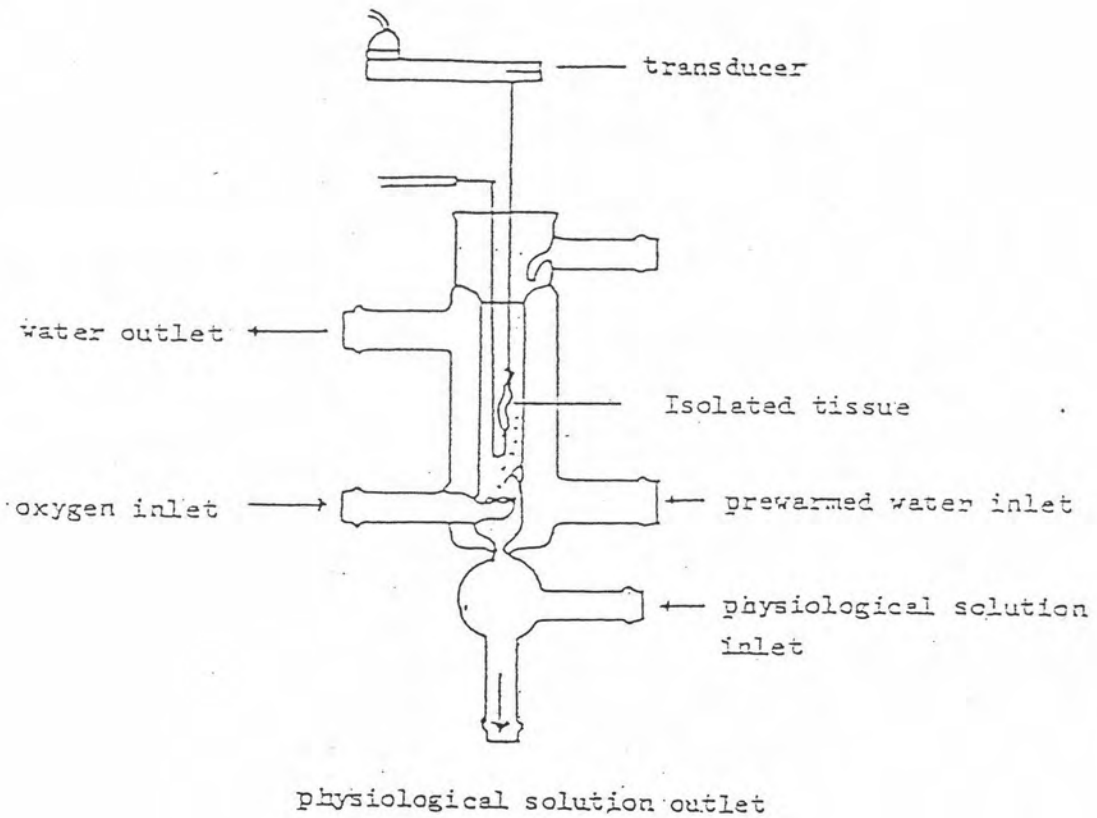
2.1 เครื่องมือวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ (isometric transducer) ขนาด 100 กรัมของบริษัท Harvard

2.2 เครื่องบันทึกผลการทดลอง universal oscillograph ของบริษัท Harvard

2.3 เครื่องบันทึกผลการทดลองพร้อม เครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้า Gilson N2 ของบริษัท Harvard

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

2.5 organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และมีช่องเปิดให้อากาศผ่านเข้าออกได้ ชั้นนอกมีน้ำมาไหลเวียนซึ่งส่งมาจาก water bath โดยผ่าน thermoregulating water pump ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ตลอดเวลาที่ทำการทดลองแสดงดังรูปที่ 6



รูปภาพที่ 6 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลองกับหลอดเลือดแดงของสุกร

3 สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวต่อหลอดเลือดแดงที่ไตและหัวใจของสุกร

-acetylcholine chloride ของบริษัท Sigma

-5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex ของบริษัท Sigma

-(-)arterenol [(-)norepinephrine bitartrate] ของบริษัท Sigma

-tetraethylammonium chloride (TEA) ของบริษัท Sigma

-barium chloride($BaCl_2$) ของบริษัท Sigma

-calcium chloride ($CaCl_2$) ของบริษัท Sigma

3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นสารยับยั้งมาตรฐาน

-verapamil hydrochloride ของบริษัท Sigma

3.3 สารเคมีที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเป็น potassium channel blocker

-glibenclamide ของบริษัท Sigma

-TEA ของบริษัท Sigma

3.4 สารทดลอง

สารสกัดบริสุทธิ์จากเปลือกลำต้นและใบของต้นตาเสือทุ่ง (D. cyrtobotryum Miq.)

4. แกส

ในการทดลองนี้ใช้แกสคาร์บอเจน (carbogen gas) ประกอบด้วย CO_2 5% + O_2 95%

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองในหลอดทดลอง(in vitro study) โดยการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาจากหัวใจและไตของสุกร เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง (D. cyrtobotryum Miq.) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่ไตและหัวใจของสุกร

1 การแยกหลอดเลือดแดงจากไตและหัวใจของสุกรที่ถูกนำมาชำแหละ

1.1 การแยกหลอดเลือดแดงจากหัวใจของสุกร

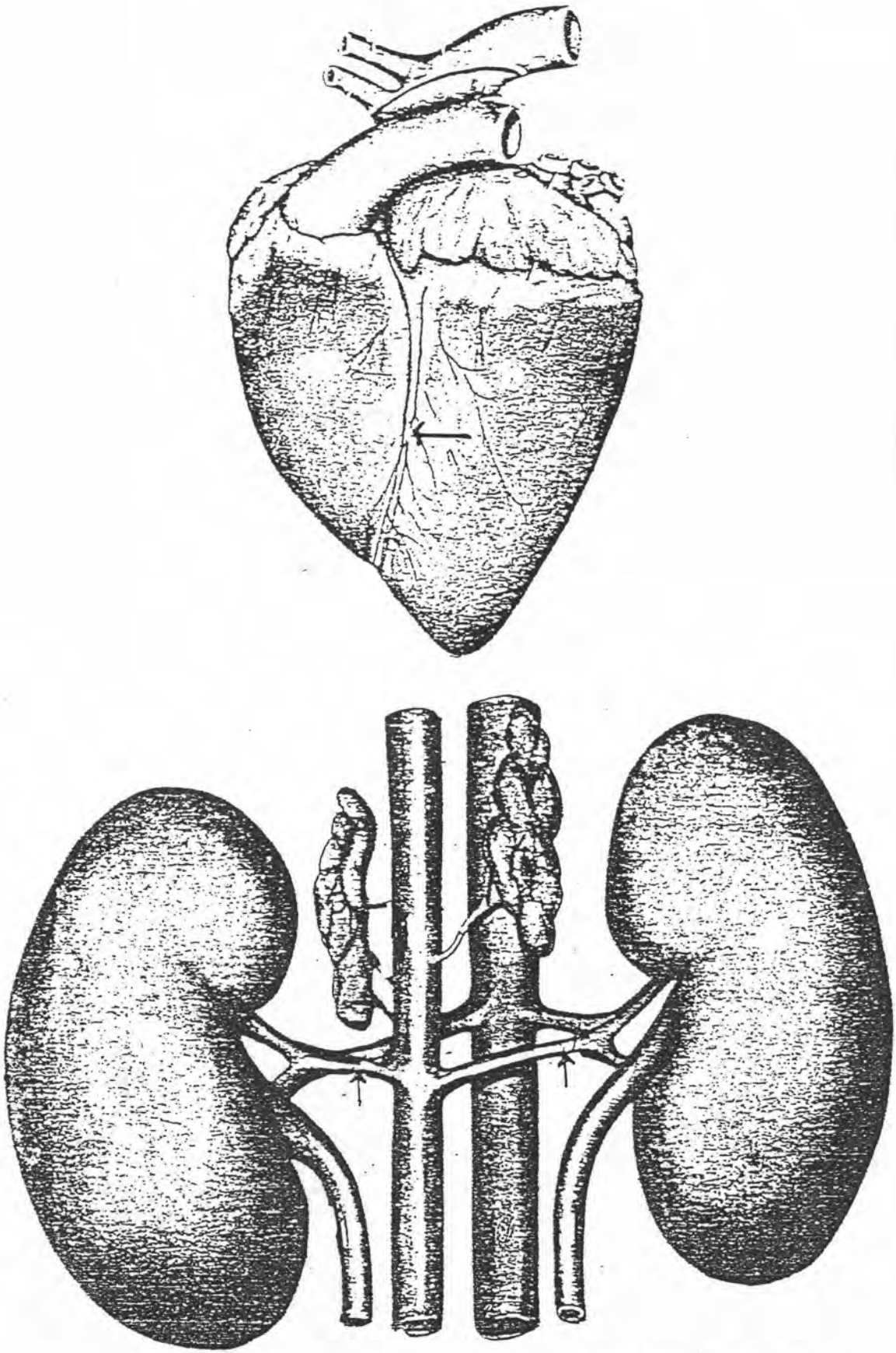
นำอวัยวะบริเวณช่องอกของสุกรซึ่งถูกฆ่าตามกรรมวิธีของโรงฆ่าสัตว์ภายใน 20 นาที แยกเอาหัวใจค่อย ๆเลาะหลอดเลือดแดงที่เลี้ยงหัวใจ (coronary artery) สังเกตจากหลอดเลือดแดงหัวใจแยกมาจากหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta)ดังรูปที่ 7 ใช้ใบมีดเบอร์ 15 (blade no. 15)กรีดบริเวณข้างๆหลอดเลือดแดงหัวใจโดยไม่ทำให้หลอดเลือดฉีกขาด นำเส้นด้ายมาคล้องหลอดเลือดหัวใจแล้วมัดให้แน่นจึงใช้กรรไกรเลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่ติดข้างๆหลอดเลือดแดงหัวใจออกให้หมด เลาะหลอดเลือดแดงหัวใจให้ได้ความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร ตัดหลอดเลือดให้ขาดแล้วนำมาแช่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลาย Krebs Henseleit(รายละเอียดดังตารางที่ 3) ประมาณ 150 มิลลิลิตร ที่ผ่านแกสคาร์บอเจน (carbogen gas) นาน 5 นาที (pH 7.35-7.45) อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การแยกหลอดเลือดแดงจากไตสุกร

แยกหลอดเลือดแดงจากไตสุกรที่ถูกฆ่าตาย ตามกรรมวิธีของโรงฆ่าสัตว์แล้วนำมาชำแหละโดยผ่าบริเวณกลางลำตัว เลาะเยื่อบุที่หุ้มไตออกจะพบหลอดเลือดแดงไต (renal artery) ของสุกรชัดเจนโดยสังเกตหลอดเลือดที่แยกเป็นแขนงจากหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ดังภาพ 7 ซึ่งสามารถแยกหลอด

ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย standard physiological ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสารละลายที่ใช้ องค์ประกอบ (mM/lt.)	Krebs-Henseliet	Ca^{2+}-free KHS	high K^{+}- depolarizing	Ca^{2+} and HCO_3^{-}
sodium chloride	118.00	118.00	27.00	136.90
potassium chloride	4.70	4.70	100.00	5.40
magnesium chloride	–	2.52	0.54	1.00
magnesium sulfate	1.64	1.64	–	–
calcium chloride	2.52	–	–	–
sodium bicarbanate	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	–	–	–	23.80
purified water qs.	1 lt.	1 lt.	1 lt.	1 lt.



รูปภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งของหลอดเลือดแดงที่แยกจากหัวใจและไตของสุกร

เลือดแดงจากไตและหลอดเลือดดำจากไตโดยสังเกตจากผนังหลอดเลือดแดงจากไตมีความหนาและเหนียวกว่าหลอดเลือดดำจากไต เลาะหลอดเลือดไตสุกรให้ได้ความยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร ผูกปลายหลอดเลือดแดงจากไตด้วยด้ายให้แน่น ตัดหลอดเลือดไตสุกรแล้วนำมาแช่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลาย Krebs Henseleit ประมาณ 150 มิลลิลิตรที่ผ่านแกสคาร์บอเจนนาน 5 นาที อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นำกลับมาห้องปฏิบัติการ

2 การเตรียมหลอดเลือดเพื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ

นำกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจและไตที่ตัดเก็บบรรจุใน flaskมาแยกใส่ petridish ซึ่งบรรจุสารละลาย Krebs Henseleitโดยผ่านแกสคาร์บอเจนตลอดเวลา เตรียมหลอดเลือดเพื่อใช้ทดลองโดยตัดแบบเกลียว (Blatter และคณะ ,1978) ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้างโดยปลายข้างหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ใน organ bath 2 ชั้น ภายในบรรจุสารละลาย Krebs Henseleit ปริมาตร 20 มิลลิลิตรและผ่านแกสคาร์บอเจนตลอดเวลาซึ่งควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียสตลอดการทดลองโดยใช้ thermoregulating water pump สูบน้ำไหลเวียนจาก water bath กับ organ bath ปลายที่เหลืออีกข้างหนึ่งของหลอดเลือดใช้ด้ายผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล universal oscillographและขยายสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณ Gilson จึงดึงกล้ามเนื้อให้มีแรงตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 0.5-0.8 กรัม equilibrate หลอดเลือดประมาณ 150 -180 นาทีให้หลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ โดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาที หลังจากนั้นจึงเริ่มทำการทดลองต่อไป

3 การทำวิจัย

3.1 การศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง (D. cyrtobotryum Miq.) ต่อการกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่หัวใจและไตของสุกรให้หดตัวด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว

3.1.1 ศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว Ach,5-HT

ศึกษา dose-response curveของสารกระตุ้นการหดตัว Ach แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 10^{-8},10^{-7},10^{-6},10^{-5}และ 10^{-4}โมลาร์(M.) ตามลำดับต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit หลาย ๆ ครั้ง incubate หลอดเลือดนาน 30 นาทีโดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดพักตัวเต็มที่จึงทำการศึกษาต่อไป โดยให้อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$ โมลาร์ประมาณ 10 นาทีจึงให้ Ach ความเข้มข้นต่างๆเหมือนกับกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง) กับกลุ่มทดลอง (กลุ่มที่ให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง) ในขนาดความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$ M.

ศึกษา dose-response curveของสารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจโดยให้ 5-HTแบบสะสมขนาดความเข้มข้น 10^{-8},10^{-7},10^{-6},10^{-5} และ 10^{-4} โมลาร์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจ เมื่อให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งขนาด $1.24x10^{-4}$ โมลาร์นาน 10 นาทีก่อน จึงให้ cumulative dose ของ 5-HT ต่อมาตามลำดับดังแสดงข้างต้น

3.1.2 ศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่ไตของสุกรโดยใช้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวNE , 5-HT

ศึกษา dose-response curveของสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว NE แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 10^{-8},10^{-7},10^{-6},10^{-5}และ 10^{-4} โมลาร์ตามลำดับต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตของสุกร หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit หลายๆครั้ง incubate กล้ามเนื้อ

หลอดเลือดไตนานประมาณ 30 นาทีโดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาทีเพื่อให้หลอดเลือดพักตัวเต็มที่ ทำการศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งประมาณ 10 นาทีจึงให้ NE แบบสะสมขนาดดังข้างต้น เปรียบเทียบผลการทดลอง ระหว่างไม่ให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งและขณะให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งขนาดความเข้มข้น 1.24×10^{-4} โมลาร์

ศึกษา dose-response curveของสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดไต 5-HTแบบสะสมขนาดความเข้มข้น $10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$และ 10^{-4} โมลาร์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตเมื่อให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งขนาด 1.24×10^{-4}โมลาร์นาน 10 นาทีก่อนจึงให้ cumulative dose ของ 5-HT ต่อมาตามลำดับดังแสดงข้างต้น

3.2 การศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจให้หดตัวโดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ในสารละลาย potassium depolarizing

เตรียมกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจ incubate ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit (รายละเอียดดังตารางที่ 3) โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 15 นาที จนกระทั่งกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลายจากสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit เป็นสารละลาย potassium depolarizing (รายละเอียดดังตารางที่ 3) incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจจนกระทั่งกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ ศึกษาผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจ โดยให้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 2,4,6,8 และ 10 มิลลิโมล (mM.)ตามลำดับ หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit หลายๆครั้งจนกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ จึง incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดต่อโดยการเปลี่ยนสารละลายที่ใช้จากสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit เป็นสารละลาย potassium depolarizing ให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจพร้อมที่จะหดตัว จึงทำ

การศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง โดยให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งก่อนนานประมาณ 10 นาทีจึงให้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์แบบสะสมขนาดดังแสดงข้างต้น

เปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างcumulative dose response curve ของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ขณะไม่ให้สารสกัดอัลคาลอยด์จากตาเสือทุ่งและขณะให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ขนาดความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$ โมลาร์

3.3 การศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจและไตของสุกรให้หดตัวโดยใช้สารละลาย $BaCl_2$

3.3.1 ศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ต่อการกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจของสุกรให้หดตัวโดยใช้สารละลาย $BaCl_2$

เตรียมกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจโดย incubate ในสารละลาย HCO_3^-และ Ca^{2+}-free Krebs Henseleit(รายละเอียดดังตารางที่ 3) นานประมาณ 120 - 180 นาทีโดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 15 นาทีจนกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่ จึงให้สารละลายแบเรียมคลอไรด์แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 5,10,15,20 และ 30 มิลลิโมลตามลำดับ หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย HCO_3^- และ Ca^{2+}-free Krebs Henseleit หลายๆครั้ง incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดในสารละลาย HCO_3^- และ Ca^{2+}-free Krebs Henseleit นานประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาที ให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดพักตัวเต็มที่และมีแรงตึงคงที่ จึงให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$ โมลาร์ประมาณ 10 นาที จึงให้สารละลายแบเรียมคลอไรด์แบบสะสมขนาดดังแสดงข้างต้น

เปรียบเทียบผลการทดลอง ขณะไม่ให้กับขณะที่ให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$ โมลาร์

3.3.2 ศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ต่อการกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตของสุกรให้หดตัว โดยใช้สารละลายแบเรียมคลอไรด์

เตรียมหลอดเลือดไตโดย incubateในสารละลายHCO_3^- และ Ca^{2+}-free Krebs Henseleit (รายละเอียดดังตารางที่ 3)นานประมาณ 120-180 นาทีโดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 15 นาทีจนกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่ จึงให้สารละลายแบเรียมคลอไรด์แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 5,10,15, 20 และ 30 มิลลิโมลตามลำดับ หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย HCO_3^- และ Ca^{2+}-free Krebs Henseleit หลายๆครั้ง incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดในสารละลาย HCO_3^- และ Ca^{2+}-free Krebs Henseleit นานประมาณ 30 นาทีโดยเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดพักตัวเต็มที่และมีแรงตึงคงที่จึงให้อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งความเข้มข้น 1.24×10^{-4} โมลาร์ประมาณ 10 นาที จึงให้สารละลายแบเรียมคลอไรด์แบบสะสมขนาดดังแสดงข้างต้น เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ขณะไม่ให้กับขณะที่ให้อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งขนาดความเข้มข้น 1.24×10^{-4} โมลาร์

3.4 การศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจและไตให้หดตัวด้วยสารละลาย TEA

3.4.1 ศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อ การกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจให้หดตัวด้วย TEA แบบสะสมขนาด

ศึกษา dose-response curve ของสารละลาย TEA ที่กระตุ้นหลอดเลือดเนื้อหัวใจให้หดตัวโดยให้สารละลาย TEA แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 2,4,6,8 และ 10 มิลลิโมลตามลำดับ หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit หลายๆครั้งโดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาทีประมาณ 2-3 ครั้งเพื่อให้หลอดเลือดพักตัวเต็มที่ จึงทำการศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งนาน 10 นาทีแล้วให้สารละลาย TEA แบบสะสมขนาดดังข้างต้น

เปรียบเทียบผลการทดลองขณะไม่ให้อัลคาลอยด์หลักกับขณะที่ให้อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งขนาดความเข้มข้น 1.24×10^{-4} โมลาร์

3.4.2 ศึกษาผลของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ต่อการกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตให้หดตัวด้วย TEA แบบสะสมขนาด

ศึกษา dose-response curve ของสารละลาย TEA ที่กระตุ้นหลอดเลือดไตให้หดตัวโดยให้สารละลาย TEA แบบสะสมขนาด ความเข้มข้น 2,4,6,8 และ 10 มิลลิโมลตามลำดับหลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit หลายๆครั้ง โดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาทีประมาณ 3-4 ครั้งเพื่อให้หลอดเลือดพักตัวเต็มที่ จึงทำการศึกษาต่อไปโดยให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งนาน 10 นาทีแล้วให้สารละลาย TEA แบบสะสมขนาดดังข้างต้น เปรียบเทียบผลการทดลองขณะไม่ให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักกับขณะให้อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งความเข้มข้น 1.24×10^{-4} โมลาร์

3.5 การศึกษาผลของ TEA และglibenclamideในการต้านฤทธิ์ของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจและไตของสุกรซึ่งกระตุ้นโดยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว

3.5.1 ศึกษาผลของ TEA และ glibenclamide ในการต้านฤทธิ์ของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง และ verapamil ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจของสุกรซึ่งกระตุ้นโดยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว Ach และ 5-HT ตามลำดับ

3.5.1.1 กระตุ้นหลอดเลือดหัวใจด้วย Ach

incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจด้วยสารละลาย Krebs Henseleit จนกระทั่งหลอดเลือดหัวใจมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดหัวใจให้หดตัวโดยใช้ Ach ความเข้มข้น 4×10^{-5} โมลาร์ นานประมาณ

5 นาทีให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุด จึงให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$ โมลาร์นานประมาณ 10 นาทีให้กล้ามเนื้อคลายตัวเต็มที่ จึงให้ TEA ความเข้มข้น 4 มิลลิโมล สังเกตผลการทดลองที่ได้ หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit หลาย ๆ ครั้งเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทุกๆ 15 นาที incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดนานประมาณ 120-150 นาทีจนมีแรงตึงตัวคงที่จึงให้ Ach ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ กระตุ้นหลอดเลือดหัวใจให้หดตัวนานประมาณ 5 นาทีให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุด จึงให้ verapamil (calcium antagonist) ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ นานประมาณ 10 นาทีให้หลอดเลือดคลายตัวเต็มที่ จึงให้ TEA 4 มิลลิโมล สังเกตผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบผลของ TEA ในการต้านฤทธิ์ของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งกับ verapamil ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจของสุกรซึ่งกระตุ้นโดย Ach

incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจด้วยสารละลาย Krebs Henseleit จนกระทั่งกล้ามเนื้อหัวใจมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดหัวใจให้หดตัวโดยใช้ Ach ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ นานประมาณ 5 นาทีให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุด จึงให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$โมลาร์ นานประมาณ 10 นาทีให้กล้ามเนื้อคลายตัวเต็มที่ จึงให้ glibenclamide ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ มิลลิโมล สังเกตผลการทดลองที่ได้ หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit หลายๆครั้ง incubate หลอดเลือดนาน 120-150 นาทีโดยเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทุก 15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่จึงให้ Ach ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ กระตุ้นหลอดเลือดหัวใจให้หดตัวนานประมาณ 5 นาทีเพื่อให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุด จึงให้ verapamil ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ นาน 10นาทีเพื่อให้หลอดเลือดคลายตัวเต็มที่จึงให้ glibenclamide ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ มิลลิโมล สังเกตผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบผลของ glibenclamide ในการต้านฤทธิ์ของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งกับ verapamil ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจของสุกรซึ่งกระตุ้นโดย Ach

3.5.1.2 กระตุ้นหลอดเลือดหัวใจด้วย 5-HT

ศึกษาผลของ TEA และ glibenclamide ในการต้านฤทธิ์ของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งและ verapamil ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจของสุกรซึ่งกระตุ้นโดยสารกระตุ้นการหดตัว 5-HT ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ ซึ่งทำการศึกษาดังข้างต้นโดยการเปลี่ยนสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวจาก Ach เป็น 5-HT

3.5.2 ศึกษาผลของ TEA และ glibenclamide ในการต้านฤทธิ์ของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง และ verapamil ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตของสุกรซึ่งกระตุ้นโดย สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว NE และ 5-HT ตามลำดับ

3.5.2.1 กระตุ้นหลอดเลือดไตด้วย NE

incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดไตด้วยสารละลาย Krebs Henseleit จนกระทั่งหลอดเลือดไตมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดไตให้หดตัวโดยใช้ NE ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ นานประมาณ 5 นาทีให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุด จึงให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$ โมลาร์ นานประมาณ 10 นาที เพื่อให้หลอดเลือดคลายตัวเต็มที่จึงให้ TEA ความเข้มข้น 4 มิลลิโมล สังเกตผลการทดลองที่ได้ หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit หลายๆครั้ง incubate หลอดเลือดนาน 120-150 นาทีโดยเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทุก 15 นาทีจนกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่จึงให้ NE ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ กระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวนานประมาณ 5 นาทีให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุด จึงให้ verapamil ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ นานประมาณ 10 นาที ให้หลอดเลือดคลายตัวเต็มที่จึงให้ TEA ความเข้มข้น 4 มิลลิโมล สังเกตผลการทดลองที่ได้ เปรียบเทียบผลของ TEA ในการต้านฤทธิ์ของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งกับverapamil ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตของสุกร ซึ่งกระตุ้นโดย NE

incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดไตด้วยสารละลาย Krebs Henseleitจนกระทั่งกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่กระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวโดยใช้ NE ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์นานประมาณ 5 นาทีให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดหดตัวสูงสุด จึงให้สารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งความเข้มข้น $1.24x10^{-4}$ โมลาร์นานประมาณ 10นาที ให้กล้ามเนื้อคลายตัวเต็มที่จึงให้ glibenclamide ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ มิลลิโมลสังเกตผลการทดลองที่ได้หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleitหลายๆครั้ง เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทุกๆ 15 นาที incubate หลอดเลือดนานประมาณ 120-150 นาทีจนกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่จึงให้ NE ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์กระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดให้หดตัวนานประมาณ 5 นาที ให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดหดตัวสูงสุดจึงให้ verapamil ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ นานประมาณ 10 นาทีให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดคลายตัวเต็มที่จึงให้ glibenclamide ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ มิลลิโมลสังเกตผลการทดลองที่ได้ เปรียบเทียบผลของ glibenclamide ในการต้านฤทธิ์ของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งกับ verapamil ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตของสุกรซึ่งกระตุ้นโดย NE

3.5.2.2 กระตุ้นหลอดเลือดไตด้วย 5-HT

ศึกษาผลของ TEA และ glibenclamide ในการต้านฤทธิ์ของสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งและ verapamil ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตของสุกรซึ่งกระตุ้นโดย สารกระตุ้นการหดตัว 5-HT ความเข้มข้น $4x10^{-5}$ โมลาร์ซึ่งทำการศึกษาดังข้างต้น โดยการเปลี่ยนสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวจาก NE เป็น 5-HT

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

ผลการทดลองประเมินโดยการวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือด นำผลที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์โดยเทียบความเข้มข้นสูงสุดเป็น maximum response มีค่าเป็น 100 %

รายงานผลการทดลองที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการเปรียบเทียบความแตกต่าง ระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง)กับกลุ่มทดลอง (กลุ่มที่ได้รับสารสกัดอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง) โดยใช้ student's paired 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 antagonistแสดงในรูป pD_2 คำนวณจากสมการได้ดังนี้

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

เมื่อ [B] คือความเข้มข้นของ competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

$[A_B]$ และ $[A_o]$ คือความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ที่ทำให้เกิด 50 % response เมื่อมีและไม่มี agonist ตามลำดับ

$$pD_2 = -\log[B] + \log\{(E_{AM}/E_{AMB})-1\}$$

เมื่อ [B] คือ ความเข้มข้นของ non-competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

E_{AM} และ E_{AMB} คือค่าการหดตัวสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้นเมื่อไม่มีและมีสารยับยั้งตัวอยู่ด้วยตามลำดับ