บทที่ 2

การดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ wistar เพศผู้ และหนูตะเภา น้ำหนักระหว่าง 200-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 2-3 กิโลกรัม จากคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เครื่องมือ

2.1 organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วย หลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) มีความจุ 20 มิลลิลิตร และมีช่องเปิดให้ก๊าซ carbogen (ประกอบด้วย O_2 95% และ CO_2 5%) ผ่านเข้าได้ ชั้นนอกมีน้ำอุ่นซึ่งส่งมาจาก water bath โดย thermoregulating water pump คอยควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ ที่ 37±0.5 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 5

2.2 water bath และ thermoregulatin 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 สารเคมีที่ใช้เป็นสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex (Sigma)

norepinephrine (Sigma)

potassium chloride (Sigma)

barium chloride (May & Baker)

histamine (Sigma)

3.2 สารทดลอง

CU-763-10-01 (เป็นสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์โดย ผศ.ดร.ชำนาญ ภัตรพานิช และคุณเฉลิมเกียรติ สงคราม ภาควิชาเภสัชเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเตรียมในรูปสารละลาย ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย)

3.3 สารที่ใช้ในการทดลองวัดความดันโลหิต

heparin sodium (Upjohn)

pentobarbital sodium (Sanofi)

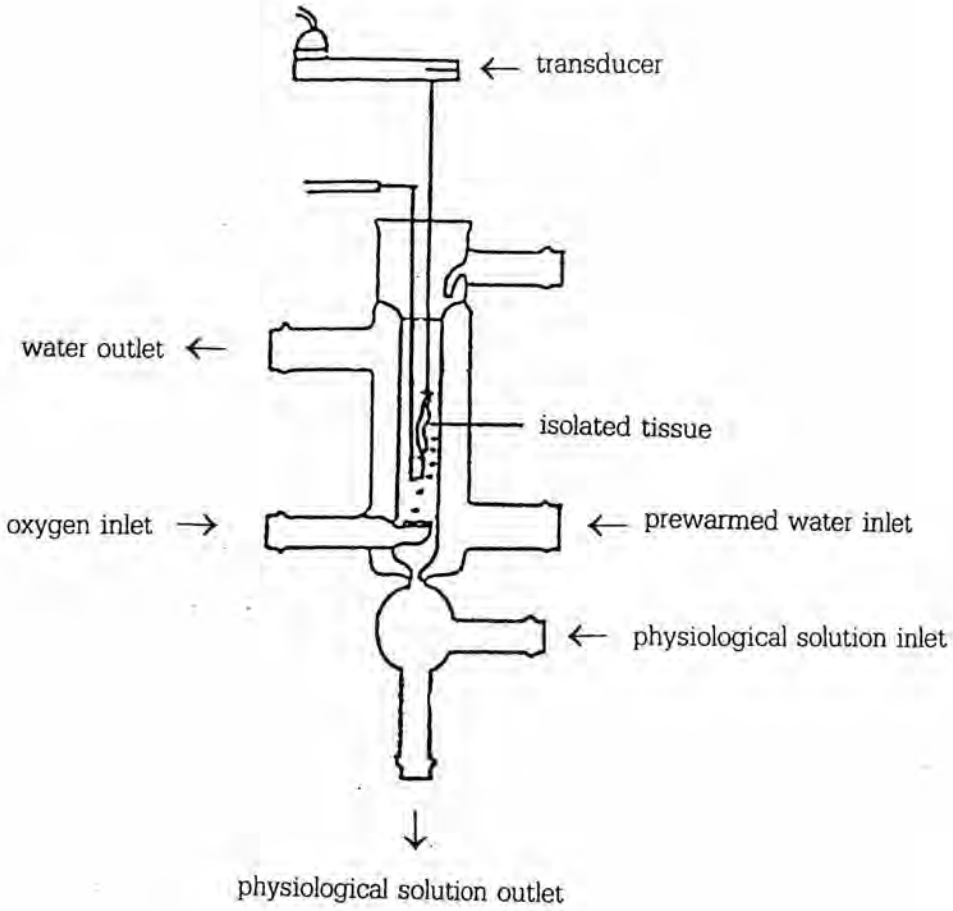
4. Carbogen gas

วิธีการดำเนินการทดลอง

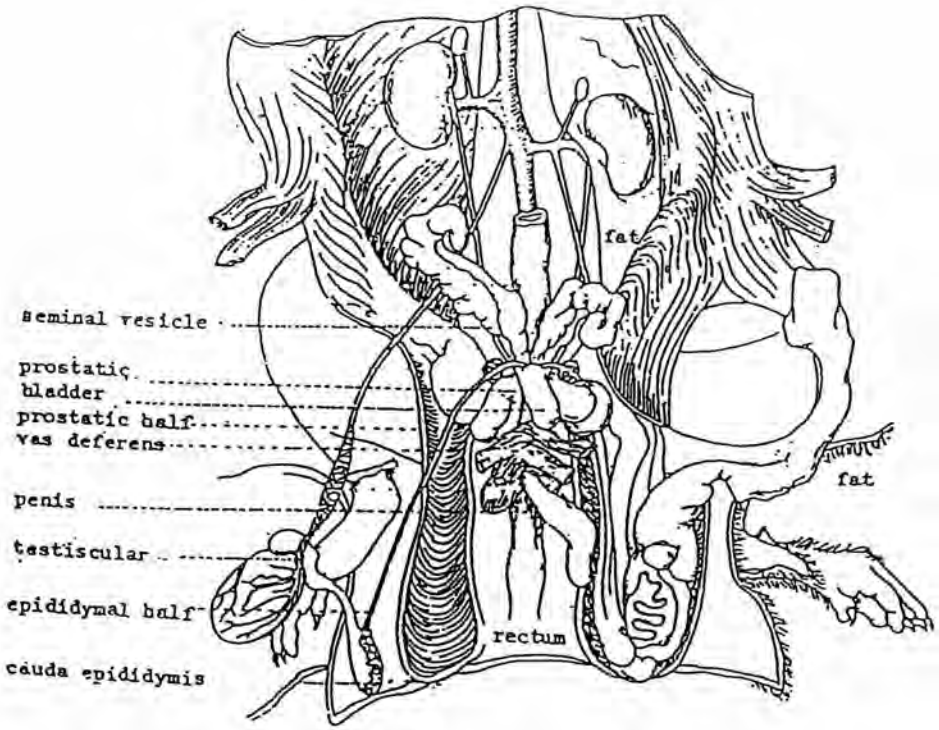
1. การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบ

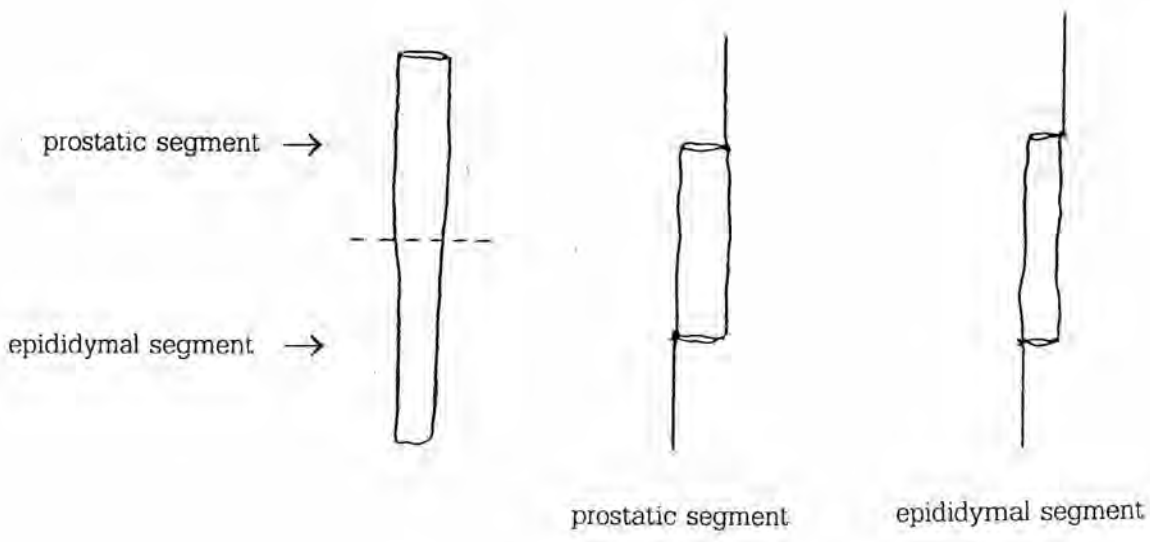
1.1 การเตรียมท่อนำอสุจิ (vas deferens) หนูขาว

ใช้หนูขาวเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม โดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณหัว และรีบดึงคอ ผ่าตัดเปิดช่องท้องแยกท่อนำอสุจิ แช่ในสารละลาย Krebs Henseleit (ตารางที่ 2) ใน petridish ซึ่งมีก๊าซ carbogen ผ่านอยู่ตลอดเวลา ตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและหลอดเลือดออกให้หมด ใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร สำหรับล้างภายในท่ออสุจิ ด้วยสารละลาย Krebs Henseleit แล้วตัดให้มีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วน prostatic segment และส่วน epididymal segment ดังภาพที่ 6 ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit อยู่ 20 มิลลิลิตร และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา อุณหภูมิ 37±0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล (universal oscillograph) และขยายสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณ Gilson ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 0.5 กรัม แล้ว equilibrate เนื้อเยื่อ



ภาพที่ 5 การจัดเครื่องมือ organ bath สำหรับทดลองกับ isolated organ





ภาพที่ 6 ตำแหน่งท่อนำอสุจิ (vas deferens) และการผูกท่ออสุจิหนูขาว

ประมาณ 60 นาที (โดยจะเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาที) จนกระทั่งกล้ามเนื้อมีความตึงตัวคงที่

1.2 การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) หนูขาว

ใช้หนูขาวเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม โดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณหัว และรีบดึงคอ ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายหัวใจ ปอด ออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่ที่กระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ออกมาวางบน petridish ที่มีสารละลาย Krebs Henseleit ซึ่งมีก๊าซ carbogen ผ่านอยู่ตลอดเวลา ตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ตัดหลอดเลือดเป็นเกลียว (spiral) แล้วตัดเป็นท่อนยาว 1.5 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit อยู่ 20 มิลลิลิตร

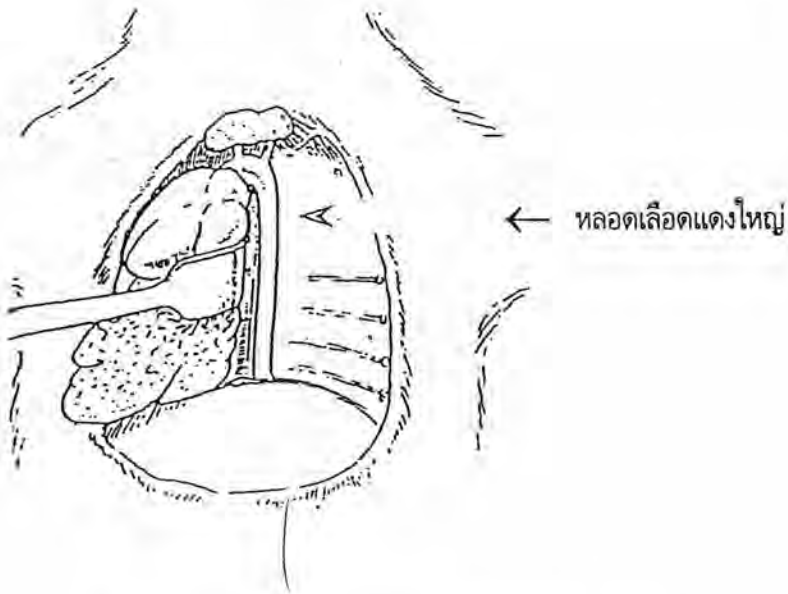
ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของ Physiological solution (มิลลิโมล/ลิตร)

สารเคมี	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

และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลาอุณหภูมิ 37±0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล (universal oscillograph) และขยายสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณ Gilson ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว equilibrate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที (โดยจะเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาที) จนกระทั่งกล้ามเนื้อมีความตึงตัวคงที่

1.3 การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) กระต่าย

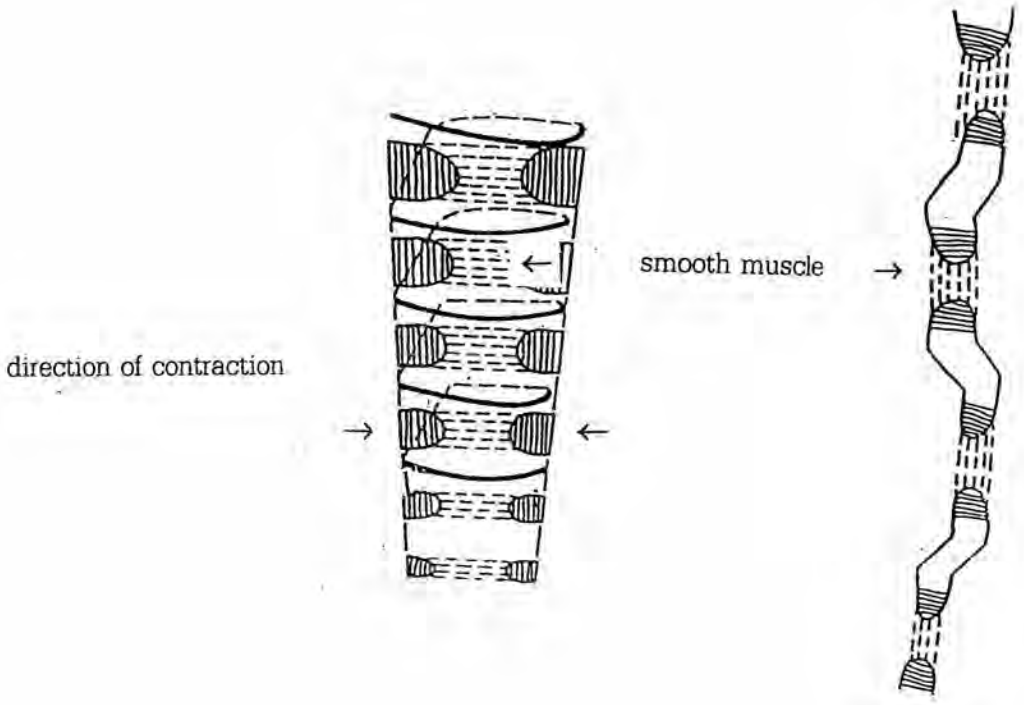
ใช้กระต่ายเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม โดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณหัว และรีบดึงคอ ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายหัวใจ ปอด ออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่ที่กระดูกสันหลัง (ดังภาพที่ 7) ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ออกจากตัวมาวางบน petridish ที่มีสารละลาย Krebs Henseleit ซึ่งมีก๊าซ carbogen ผ่านอยู่ตลอดเวลา ตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ตัดหลอดเลือดเป็นเกลียว (spiral) แล้วตัดแบ่งยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit อยู่ 20 มิลลิลิตร และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลาอุณหภูมิ 37±0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล (universal oscillograph) และขยายสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณ Gilson ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว equilibrate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที (โดยจะเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาที) จนกระทั่งกล้ามเนื้อมีความตึงตัวคงที่



ภาพที่ 7 ตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่ (thoracic aorta)

1.4 การเตรียมกล้ามเนื้อหลอดลม (trachea) หนูตะเภา

ใช้หนูตะเภาเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม โดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณหัว และรีบดึงคอ ผ่าตัดเปิดช่วงคอจนถึงซ่องอกแยกตัดเอาหลอดลม โดยตัดให้ต่ำลงมาจากกล่องเสียงประมาณ 5 มิลลิเมตร และตัดให้มีความยาวจนถึงขั้วปอด ออกมาวางบน petridish ที่มีสารละลาย Krebs Henseleit ซึ่งมีก๊าซ carbogen ผ่านอยู่ตลอดเวลา ตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ตัดหลอดลมเป็นเกลียว (spiral) ดังภาพที่ 8 ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปใส่ใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit อยู่ 20 มิลลิลิตร และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา อุณหภูมิ 37±0.5 องศาเซลเซียส ปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล (universal oscillograph) และขยายสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณ Gilson ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว equilibrate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที (โดยจะเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุกๆ 15 นาที) จนกระทั่งกล้ามเนื้อมีความตึงตัวคงที่



ภาพที่ 8 การเรียงตัวและวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม

2. การทดลอง

2.1 การศึกษานอกตัวสัตว์ทดลอง (in vitro)

2.1.1 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่แยกจากหนูขาว

2.1.1.1 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิ โดยใช้สารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆ ดังนี้

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

norepinephrine ขนาด $1x10^{-5}$ M

potassium chloride ขนาด 50 mM

barium chloride ขนาด $1x10^{-3}$ M

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น เมื่อกล้ามเนื้อมีการตอบสนองจะมีการส่งสัญญาณเข้าเครื่องบันทึกผล รอให้บันทึกผลประมาณ 20-30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุก 15 นาที และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ ศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยการให้ CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิก่อนและหลังการให้ CU-763-10-01

2.1.1.2 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆ ดังนี้

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

norepinephrine ขนาด $1x10^{-6}$ M

potassium chloride ขนาด 50 mM

barium chloride ขนาด $1x10^{-3}$ M

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น เมื่อกล้ามเนื้อมีการตอบสนองจะมีการส่งสัญญาณเข้าเครื่องบันทึกผล รอให้บันทึกผลประมาณ 20-30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยน สารละลาย Krebs Henseleit ทุก 15 นาที และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ ศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยการให้ CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้

สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ก่อนและหลังการให้ CU-763-10-01

2.1.1.3 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อ Cumulative dose-response curve ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อไม่มี endothelium โดยกระตุ้นด้วย norepinephrine

เตรียมกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ขูด endothelium ออกโดยใช้ไม้พันสำลีขูดเบาๆ ด้านในของหลอดเลือด และ ใช้ Acetylcholine ซึ่งเป็น endothelium dependent vasodilator เป็นตัวทดสอบว่าไม่มี endothelium แล้วจึงนำมาทดสอบฤทธิ์ของ CU 763-10-01 โดย equilibrate หลอดเลือดในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ แล้วให้ norepinephrine แบบสะสมขนาด ($1x10^{-10}$ M - $1x10^{-6}$ M) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยน สารละลาย Krebs Henseleit ทุก 15 นาที และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ ศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยการให้ CU-763-10-01 ก่อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้ norepinephrine แบบสะสมขนาด เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง Cumulative dose-response curve ของ norepinephrine ก่อนและหลังการให้ CU-763-10-01

2.1.1.4 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อ Cumulative dose-response curve ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อมี endothelium โดยกระตุ้นด้วย norepinephrine

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ แล้วให้ norepinephrine แบบสะสมขนาด ($1x10^{-10}$ M - $1x10^{-6}$ M) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยน สารละลาย Kreb Henseleit ทุก 15 นาที และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ ศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยให้ CU-763-10-01 ก่อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้ NE แบบสะสมขนาด เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง Cumulative dose-response curve ของ NE ก่อนและหลังการให้ CU-763-10-01

2.1.1.5 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อ Cumulative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วย Calcium chloride ในสารละลาย potassium depolarizing

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย potassium depolarizing และ equilibrate ต่อจนความตึง

ของกล้ามเนื้อคงที่ แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด ($3x10^{-5}$ M - $1x10^{-2}$ M) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยน สารละลาย Kreb Henseleit ทุก 15 นาที และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ ศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยการให้ CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M, $1x10^{-5}$ M และ $5x10^{-6}$ M ก่อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง Cumulative dose-response curve ของ $CaCl_2$ เมื่อไม่มี CU-763-10-01 และเมื่อมี CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M, $1x10^{-5}$ M และ $5x10^{-6}$ M

2.1.1.6 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย norepinephrine ขนาด $1x10^{-6}$ M ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย Ca^{2+} -free Krebs Henseleit และ equilibrate ต่อจนความตึงของกล้ามเนื้อคงที่ แล้วให้ NE ขนาด $1x10^{-6}$ M จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด และคงที่ระดับหนึ่ง แล้วจึงให้ CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M บันทึกผลของ CU-763-10-01 ในการคลายตัวของหลอดเลือด

2.1.1.7 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย potassium chloride ขนาด 100 mM ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย Ca^{2+} -free Krebs Henseleit และ equilibrate ต่อจนความตึงของกล้ามเนื้อคงที่ แล้วให้ potassium chloride ขนาด 100 mM จนกระทั่งกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุด และคงที่ระดับหนึ่ง แล้วจึงให้ CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M บันทึกผลของ CU-763-10-01 ในการคลายตัวของหลอดเลือด

2.1.2 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกระต่าย

ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกระต่าย เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานต่างๆ ดังนี้

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

norepinephrine ขนาด $1x10^{-6}$ M

potassium chloride ขนาด 50 mM

barium chloride ขนาด $1x10^{-3}$ M

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้สารกระตุ้นมาตรฐานแต่ละตัวดังกล่าวข้างต้น เมื่อกล้ามเนื้อมีการตอบสนองจะมีการส่งสัญญาณเข้าเครื่องบันทึกผล รอให้บันทึกผลประมาณ 20-30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Kreb Henseleit ทุก 15 นาที และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ ศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยการให้ CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ก่อนและหลังการให้ CU-763-10-01

2.1.3 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมที่แยกจากหนูตะเภา

ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมที่แยกจากหนูตะเภา เมื่อกระตุ้นด้วย histamine ขนาด $1x10^{-6}$ M

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อและ equilibrate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงคงที่ ให้ histamine ขนาด $1x10^{-6}$ M เมื่อกล้ามเนื้อมีการตอบสนองจะมีการส่งสัญญาณเข้าเครื่องบันทึกผล รอให้บันทึกผลประมาณ 10-20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3 ครั้ง equilibrate เนื้อเยื่อต่อประมาณ 60 นาที โดยระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Kreb Henseleit ทุก 15 นาที และปรับความตึงของกล้ามเนื้อให้เท่ากับความตึงเมื่อเริ่มการทดลองและคงที่ ศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยการให้ CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นมาตรฐาน เปรียบเทียบผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม ก่อนและหลังการให้ CU-763-10-01

2.2 การศึกษาในตัวสัตว์ทดลอง (in vivo)

2.2.1 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อความดันโลหิตหนูขาวที่สลบ

ในการศึกษาผลต่อความดันโลหิต โดยทำให้หนูขาวสลบด้วย pentobarbitone ขนาด 60 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง เมื่อหนูสลบแล้วผ่าตัด canulate หลอดลมด้วยท่อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เพื่อเปิดทางเดินหายใจให้โล่ง และหนูสามารถหายใจได้ด้วยตัวเอง ผ่าตัด canulate common carotid artery ด้วย polyethylene tube โดยต่อกับ pressure transducer ที่มี heparinized saline (heparin 1000 iu/ 0.9% NaCl 50 มิลลิลิตร) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และต่อ pressure transducer กับเครื่องบันทึกความดันโลหิต ผ่าตัด canulate femoral vein ด้วย polyethylene tube ซึ่งบรรจุด้วย heparinized saline ต่อกับ three ways stop cock สำหรับฉีดยาเข้าทางหลอดเลือดดำ จากนั้นรอให้ความดันโลหิตของหนูคงที่ อย่างน้อย 30 นาทีก่อน

เริ่มการทดลอง (ภาพที่ 9) บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตของหนูที่สลบเมื่อฉีด CU 763-10-01 ขนาด 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม โดยบันทึกเป็นเวลา 30 นาทีหลังฉีด CU 763-10-01 เข้าทางหลอดเลือดดำ

2.2.2 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อความดันโลหิตกระต่ายที่สลบ

ในการศึกษาผลต่อความดันโลหิต โดยทำให้กระต่ายสลบด้วย pentobarbitone ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง เมื่อกระต่ายสลบแล้วผ่าตัด canulate common carotid artery ด้วย polyethylene tube โดยต่อกับ pressure transducer ที่มี heparinized saline (heparin 1000 iu/ 0.9% NaCl 50 มิลลิลิตร) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และต่อ pressure transducer กับเครื่องบันทึกความดันโลหิต ผ่าตัด canulate femoral vein ด้วย polyethylene tube ซึ่งบรรจุด้วย heparinized saline ต่อกับ three ways stop cock สำหรับฉีดยาเข้าทางหลอดเลือดดำ จากนั้นรอให้ความดันโลหิตของหนูคงที่ อย่างน้อย 30 นาทีก่อนเริ่มการทดลอง บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตของกระต่ายที่สลบเมื่อฉีด CU 763-10-01 ขนาด 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม โดยบันทึกเป็นเวลา 30 นาทีหลังฉีด CU 763-10-01 เข้าทางหลอดเลือดดำ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of mean)

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองใช้ Student's paired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

การคำนวณค่า parameter

ทำโดยใช้วิธีของ Van Rossum, Hurkmans และ Wolters (1963) ดังนี้

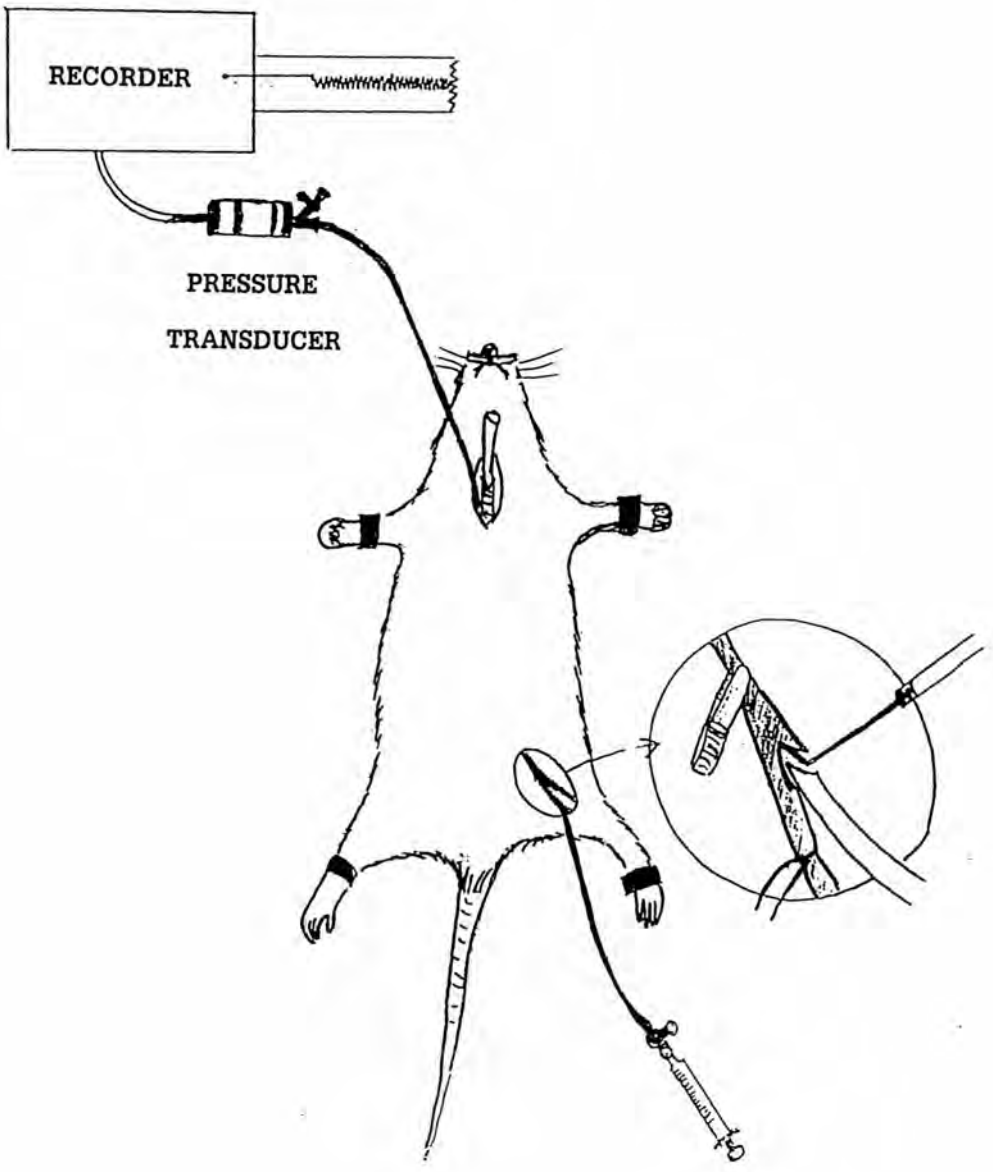
1. ค่า Logarithm ของ affinity ของ Competitive antagonist

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

pA_2 คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

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

[B] คือ ความเข้มข้นของ Competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์



ภาพที่ 9 ลักษณะหนูขาวที่สลบเพื่อวัดความดันโลหิตและการ canulate femoral vein

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

$[A_0]$ คือ ความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิดการกระตุ้น 50 เปอร์เซนต์ เมื่อไม่มี antagonist 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 เปอร์เซนต์

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