บทที่ 2

การดำเนินการวิจัย

<u>สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี</u>

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวเพศผู้ พันธุ์ wistar มีน้ำหนักระหว่าง 200 - 250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. เครื่องมือ

2.1 organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) ขนาดความจุ 20 มิลลิลิตร ชั้นนอกมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำคอยควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำจาก water bath มาควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ และมีช่องให้อากาศผ่านเข้าหลอดแก้วชั้นในได้ (รูปที่ 3)

2.2 เครื่องมือวัดการหดเกร็ง isometric transducer ของบริษัท Harvard

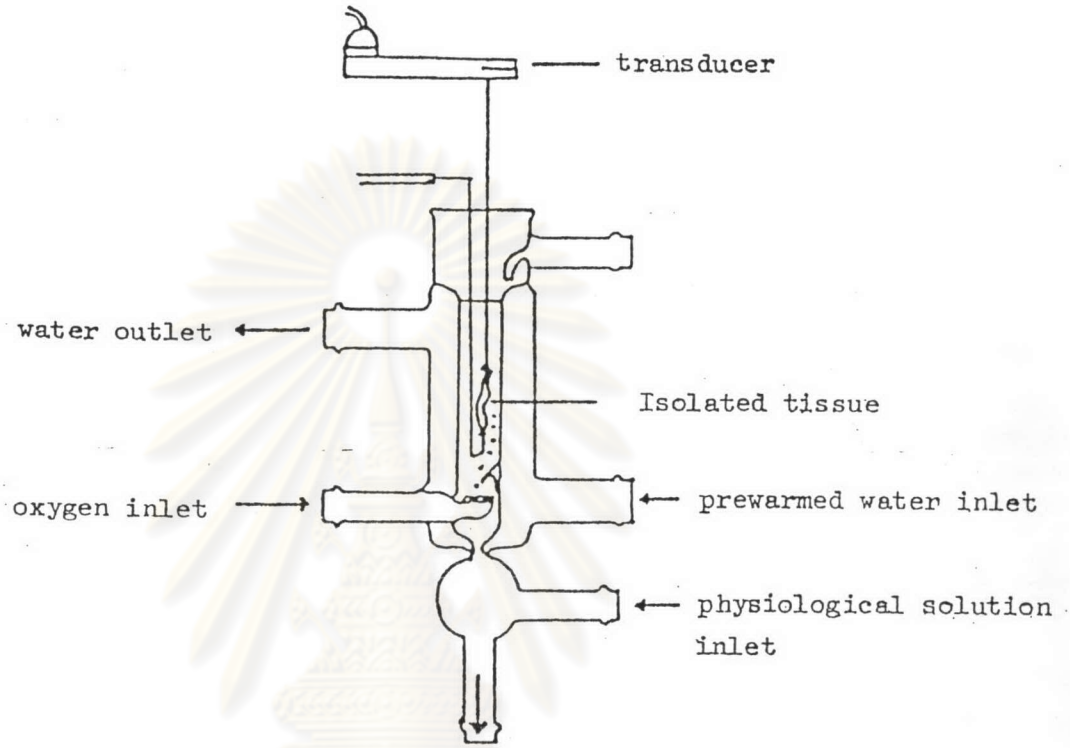
2.3 เครื่องบันทึกผลการทดลอง universal oscillograph recorder ของบริษัท Harvard

2.4 เครื่องขยายสัญญาณต่อจากเครื่องบันทึกผลการทดสอบ (Amplifier Gilson n.2) ของบริษัท Harvard

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ

noradrenaline hydrochloride	(Sigma)
calcium chloride	(Merck)
potassium chloride	(Ajac chemical)



รูปที่ 3 organ bath แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

barium chloride (May & Baker)

caffeine anhydrous (Sigma)

3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นสารยับยั้งมาตรฐาน

verapamil hydrochloride (Sigma)

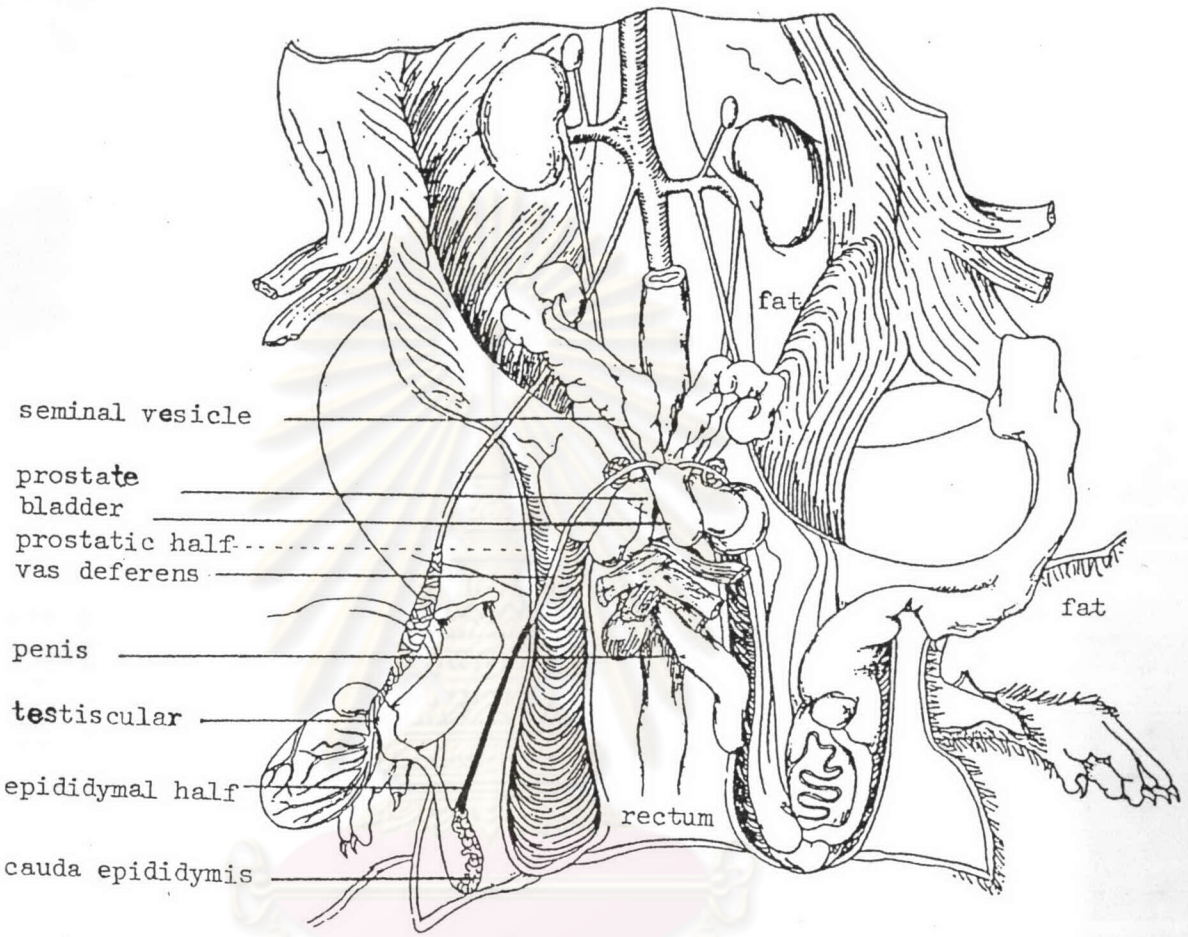
3.3 สารทดลอง

เป็นสารสกัดบริสุทธิ์ที่สกัดจากส่วนของใบของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร คือ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (AC_2) (สกัดโดย รศ. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ แห่งภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เตรียมสารทดลองอยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้น 5×10^{-2} M โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมกล้ามเนื้อท่ออสุจิ

ใช้หนูขาวเพศผู้ หนักประมาณ 200 - 250 กรัม ทำให้สลบโดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณคอและหัว ผ่าตัดเปิดช่องท้อง ตัดท่ออสุจิซึ่งอยู่ระหว่าง epididymis และ prostate gland (รูปที่ 4) นำมาแช่ใน petri-dish ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 1 ตัดแยกเอาไขมัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและหลอดเลือดออกให้หมด ล้างด้านในของท่ออสุจิโดยใช้ syring ขนาดเล็กดูดสารละลาย Krebs Henseleit แล้วฉีดผ่านท่ออสุจิอย่างระมัดระวัง จากนั้นแบ่งท่ออสุจิออกเป็น 2 ส่วน คือ prostatic และ epididymal halves ขนาดยาวประมาณ 10 - 12 มิลลิเมตร ในการวิจัยครั้งนี้ เลือกใช้ prostatic halves เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากพบว่า prostatic halves ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย KCl ได้ดีกว่า eipididymal halves (Hay and Wadsworth, 1984a) แต่การตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ไม่แตกต่างกัน (Hay and Wadsworth, 1983) ยกเว้นการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ α-adrenoceptor ที่พบว่า epididymal halves ตอบสนองดีกว่า prostalic halves (Hay and Wadsworth, 1983) ดังนั้นเฉพาะการทดลองที่กระตุ้นด้วย NA เท่านั้นที่ใช้ epididymal halves



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของท่ออสุจิ (vas deferens)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ Physiological solution (มิลลิโมล/ลิตร)

	Physiological solution		
	Krebs Henseleit	Ca^{2+}-free Krebs Henseleit	potassium depolarizing
NaCl	118.0	118.0	25.0
KCl	4.70	4.70	128.0
$CaCl_2$	2.52	-	-
$MgSO_4$	1.64	1.64	-
$NaHCO_3$	24.88	24.88	-
KH_2PO_4	1.18	1.88	-
$MgCl_2$	-	-	1.20
Glucose	5.55	5.55	11.10
HEPES	-	-	5.0
EGTA	-	0.1	0.03

Bubble with 95% O_2 plus 5% CO_2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผูกปลายด้านหนึ่งของกล้ามเนื้อท่ออสุจิที่เตรียมได้ เข้ากับแท่งพลาสติก นำไปแช่ใน organ bath ที่บรรจุสารละลาย Krebs Henseleit มีอากาศซึ่งประกอบด้วย O_2 95% + CO_2 5% ผ่านตลอด ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส อีกด้านหนึ่งของท่ออสุจิผูกติดกับ isometric transducer ที่ต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผลการทดลอง (oscillograph recorder)

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อตามวิธีการดังกล่าวแล้ว ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงตัว (tension) ประมาณ 0.5 - 0.8 กรัม แล้ว equilibrate ไว้ประมาณ 45 นาทีก่อนจะให้ยาใด ๆ ในระหว่างการ equilibrate เปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุก ๆ 15 นาที

2. การทดลอง

2.1 ศึกษาผลของ AC_2 ต่อการหดเกร็งของท่ออสุจิที่แยกจากหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นต่าง ๆ ในสารละลาย Krebs Henseleit

เนื่องจากท่ออสุจิที่แยกจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่มี spontaneous movement (Hay and Wadsworth, 1983) ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องกระตุ้นการหดเกร็งของกล้ามเนื้อด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ ดังนี้คือ NA (3×10^{-5}M), KCl (100 mM) และ $BaCl_2$ (1 mM)

ในการทดลองนี้เลือกใช้สารทดลอง AC_2 ในขนาดความเข้มข้น 1×10^{-5}M, 5×10^{-5}M และ 1×10^{-4}M เปรียบเทียบกับสารต้านแคลเซียมมาตรฐานคือ verapamil ความเข้มข้น 5×10^{-7}M, 1×10^{-6} M และ 2×10^{-6} M เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อท่ออสุจิด้วยสารกระตุ้นการหดตัวครั้งหนึ่งแล้ว ล้างสารกระตุ้นออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit หลาย ๆ ครั้งจนสังเกตเห็นกล้ามเนื้อมีสภาพกลับคืนสู่ระดับปกติก่อนถูกกระตุ้น (base line) จากนั้นจึงให้สารทดลองในความเข้มข้นที่ต้องการลงไปใน organ bath หลังจากนั้น 5 นาที จึงเริ่มให้สารกระตุ้นใหม่

นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบผลการยับยั้งการหดตัวของ AC_2 ในความเข้มข้นต่าง ๆ และเปรียบเทียบกับ verapamil

018662

2.2 ศึกษาผลของ AC_2 ต่อ cumulative dose-response curve เมื่อกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ใน depolarizing solution

เมื่อเตรียมกล้ามเนื้อท่ออสุจิและ equilibrate จนความตึงตัว (tension) ของกล้ามเนื้อคงที่แล้ว เปลี่ยนสารละลายใน organ bath (เดิมเป็นสารละลาย Krebs Henseleit) เป็น depolarizing solution ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 1 (Hay and Wadsworth, 1982) จากนั้นให้ $CaCl_2$ แบบสะสม การเพิ่มความเข้มข้นของ $CaCl_2$ แต่ละครั้ง จะให้เมื่อความตึง (tension) คงที่ (Van Rossuni et al., 1963) เมื่อได้ cumulative dose-response curve แต่ละ curve แล้ว คลายกล้ามเนื้อด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit หลาย ๆ ครั้งจนกล้ามเนื้อกลับสู่สภาวะปกติก่อนถูกกระตุ้น แล้วจึงล้างกล้ามเนื้อด้วย depolarizing solution 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 นาที จากนั้นจึงให้สารทดลองในความเข้มข้นที่ต้องการ 15 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสมสำหรับ cumulative dose-response curve ครั้งต่อไป

เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve เมื่อไม่มี AC_2, เมื่อมี AC_2 เข้มข้น 5×10^{-5}M และ 1×10^{-4}M และเมื่อมี verapamil 5×10^{-7}M

2.3 ศึกษาผลของ AC_2 ต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อท่ออสุจิในสารละลายที่ปราศจากแคลเซียม

เตรียมกล้ามเนื้อท่ออสุจิและ equilibrate จนความตึงของกล้ามเนื้อคงที่ (ประมาณ 45 นาที) เปลี่ยนสารละลายใน organ-bath จาก Krebs Herseleit solution เป็น Ca^{2+}-free Krebs Henseleit Solution ที่มี EGTA 0.1 mM โดยการล้างหลาย ๆ ครั้ง การทดลองแบ่งเป็น 2 ชุดคือ ชุดหนึ่งให้ $BaCl_2$ 1 mM เป็นตัวกระตุ้น อีกชุดหนึ่งให้ Caffeine 50 mM เป็นตัวกระตุ้น เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยสารกระตุ้นไปครั้งหนึ่งแล้ว ล้างสารกระตุ้นออกด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit ที่มี EGTA 0.1 mM หลาย ๆ ครั้งแล้ว incubate กล้ามเนื้อในสารละลาย Krebs Henseleit นาน 30 นาที ล้างออกด้วย Ca^{2+}-free Krebs

Henseleit solution ที่มี EGTA 0.1 mM หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นให้สารทดลอง 10 นาที จึงให้สารกระตุ้น ในการทดลองนี้ เพื่อป้องกันข้อผิดพลาดจากการตอบสนองเมื่อกระตุ้นซ้ำ ๆ อาจมีการทดลองเนื่องจากระดับ Ca^{2+} ในแหล่งสะสมภายในเซลลดลง จึงทำการทดลองโดยใช้ท่ออสุจิ 2 อัน ทดลองไปพร้อม ๆ กัน โดยให้อันหนึ่งเป็นตัวควบคุม ส่วนอีกอันหนึ่งให้สารทดลอง

เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ซึ่งให้ AC_2 และกลุ่มที่ให้ verapamil

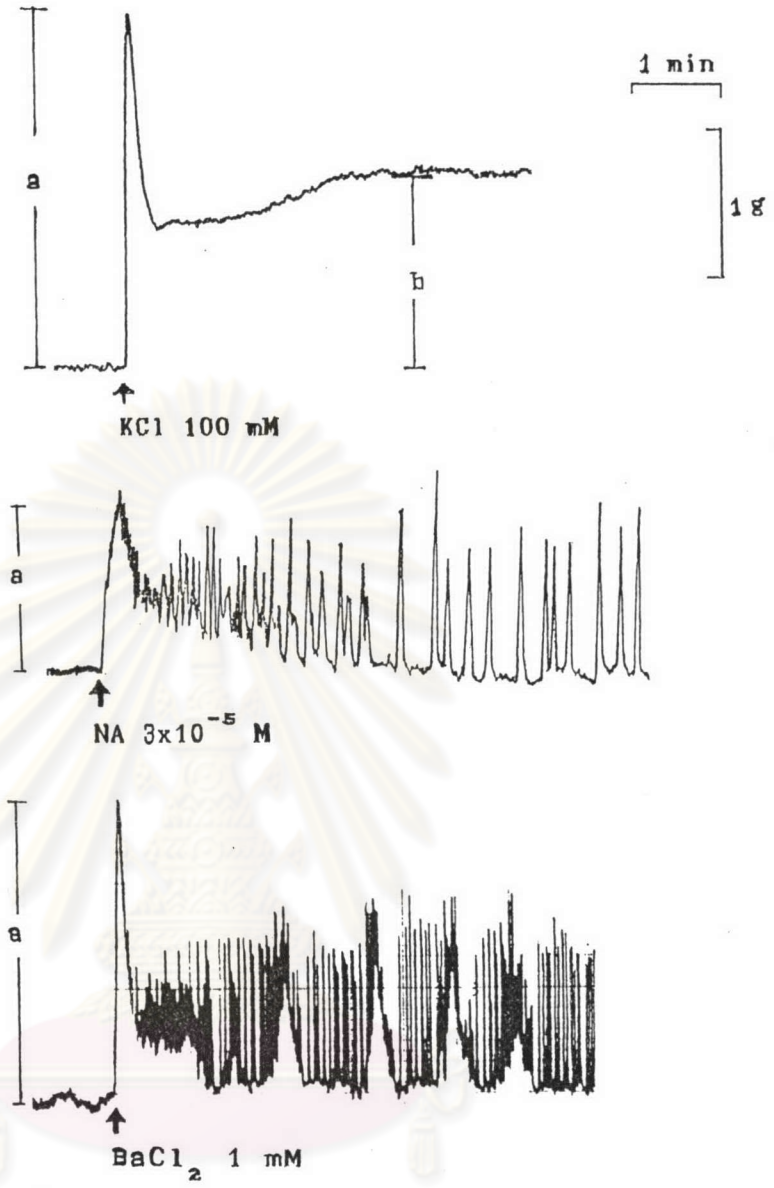
<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard errors of the mean)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ทำโดย เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมใช้ student paired และ unpaired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ในการวัดการหดเกร็งของท่ออสุจิ ที่ตอบสนองต่อสารกระตุ้น ซึ่งมีลักษณะของการหดตัวเป็นแบบ phasic ตามด้วย tonic และ phasic ตามด้วย rhythmic จะวัดแยกกัน โดยที่ phasic จะวัดการหดเกร็งสูงสุด เมื่อเริ่มให้สารกระตุ้นซึ่งเกิดขึ้นภายใน 1 นาทีหลังจากได้รับสารกระตุ้น (รูปที่ 5) การตอบสนองแบบ tonic จะวัดเมื่อกล้ามเนื้อมีความตึงตัว (tonic or tension) คงที่ ส่วนการตอบสนองแบบ rhythmic จะวัดออกมาเป็นค่าเฉลี่ยของความถี่ (mean frequency) ของการหดเกร็งแบบ rhythmic วัดในช่วงนาทีที่ 3 ถึง 8 หลังจากได้รับสารกระตุ้น

การตอบสนองแบบ phasic, tonic และ rhythmic จะแสดงในรูปของร้อยละของการหดเกร็งสูงสุดซึ่งได้จากค่าควบคุม (Percente of maximum contraction)



รูปที่ 5 แสดงวิธีการวัดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ เมื่อบันทึกจาก isometric transducer

a คือ amplitude ของการหดเกร็งแบบ phasic

b คือความแรงของการหดเกร็งแบบ tonic

frequency ของการหดเกร็งแบบ rhythmic วัดโดยวัดอัตราการหดเกร็งของกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นตั้งแต่นาทีที่ 3 ถึงนาทีที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใน cumulative dose-response curve จะวัด ความตึงตัว (tone or tension) ของกล้ามเนื้อเมื่อได้รับสารกระตุ้นใน dose ต่าง ๆ แสดงออกมาเป็นร้อยละของการหดเกร็งสูงสุด (percent of maximum response)

การคำนวณค่า drug parameter ใช้วิธีของ Van Rossum และคณะ (1963) โดยค่า logarithm ของ affinity ของ competitive antagonist แสดงในรูป pA_2 value ดังสมการ

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

[B] คือ ความเข้มข้นของสารยับยั้งตัวกระตุ้น (competitive antagonist) ในหน่วยโมลาร์

$[A_B]$ และ $[A_o]$ คือ ความเข้มข้นของสารกระตุ้น (agonist) ในหน่วยโมลาร์ ที่ทำให้เกิด 50% response เมื่อมีและไม่มี antagonist ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย