



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของตัวรับโอปิออยด์ชนิดที่ตอบสนองต่อความเครียดในการเปลี่ยนแปลง
ระบบป้องกันของทางเดินอาหารที่ควบคุมโดยผ่านกลไกผ่าน
ระบบประสาทชนิดตัวรับความรู้สึกเบื้องต้น

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สุทธาสินี ปุญญโชติ
ภาควิชา สรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของตัวรับโอปิออยด์ชนิดที่ตอบสนองต่อความเครียดในการเปลี่ยนแปลง
ระบบป้องกันของทางเดินอาหารที่ควบคุมโดยผ่านกลไกผ่าน
ระบบประสาทชนิดตัวรับความรู้สึกเบื้องต้น

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สุทธาสินี ปุญญโชติ
ภาควิชา สรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนเมธีวิจัย ประจำปี 2547 และทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ร่วมกันให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้ และเปิดโอกาสให้ผู้วิจัยได้ใช้ความรู้ความสามารถของตนเองในการทำวิจัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญ ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสบการณ์ทางด้านการทำวิจัย การพัฒนาทางด้านความคิดและวิชาการ ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย รศ.ดร.ฉัตรศรี เดชะปัญญา และ ผศ.สพ.ญ.ดร.สฤณี กลันทกานนท์ ทองทอง ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับ ศ.ดร.นทีทิพย์ กฤษณามระ ในการให้คำแนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นอย่างดี และท้ายที่สุดขอขอบคุณภาควิชาสรีรวิทยา และคณะสัตวแพทยศาสตร์ ตลอดจนจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัย สนับสนุนด้านวัสดุครุภัณฑ์ และเครื่องมือเครื่องใช้ในการทดลองที่จำเป็น ทั้งหมดนี้ล้วนมีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

Abstract

Project Code: RSA4780010

Project Title: Roles of stress-related opioid receptors on the modulation of intestinal host defense mechanism regulated by intrinsic primary afferent neurons

Investigator: Associate Professor Sutthasinee Poonyachoti,
Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science,
Chulalongkorn University

E-mail Address: sutthasinee@gmail.com

Project Period: 31 August 2004 – 30 August 2007

Opioidergic system located on sensory neurons plays role on the regulation of enteric neurotransmitter released. Chronic stress is involved in the pathogenesis of gastrointestinal disorders. The phenotype and function of neurons in submucosal neurons may be subjects for this evidence. This study aimed to investigate the gradually effects of stress on submucosal neural circuitry especially mucosal reflex in regulating mucosal defense mechanism using Ussing-voltage clamp technique to measure short circuit current (Isc), potential difference (PD) and tissue resistance (R) of rat colonic epithelium. The Ussing parameters will indicate the intestinal mechanical defense. We also examined changes in the immunoglobulin A (IgA) secretion in rat colonic content in vivo or in vitro using ELISA to indicate the secretory property involved in mucosal immunity function. The significance of sensory neural pathway on the host defense was pre-revealed by stimulating with opioids and calcitonin gene-related peptides (CGRP), substance P (SP), acetylcholine (CCh) or norepinephrine (NE), respectively in in vitro. SP and NE decreased tissue resistance and IgA secretion. For the stress experiment, male Wistar rats were immobilized using the rodent restrainer for a 60-min period, 3 (3d; acute), 7 (7d; subchronic), and 14 days (14d; chronic) consecutive days. This study suggested that tissue resistance was lowest whereas caecal IgA was highest in chronic stress rat suggesting the leakage of the intestinal mucosa. Secretory effect of CAP mediated by VR-1 on sensory neurons was decreased by 70% in 14d-rat colon. Basolaterally addition of DAMGO, DSLET or U-50,488 (1 μ M), μ -, δ - or κ -opioid receptor (OR) agonists respectively, diminished the basal Isc of control rat colon by 20–30%. SP produced the same magnitude of Isc response in control and stress rat colon. Pretreatment with DAMGO potentiated instead of inhibited the SP response by 2-fold in stress rats. These findings suggested that the submucosal neuronal reflex mediated through VR-1 and opioid receptors was modified in distal colon of chronic stress rat. Therefore, sensory neuronal plasticity could result in an inability to maintain mucosal integrity and causes stress-related intestinal disorders.

Keywords : resistant, opioid receptor, mucosal reflex, sensory neurons, immunoglobulin A

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA4780010

ชื่อโครงการ : บทบาทของตัวรับโอปิออยด์ชนิดที่ตอบสนองต่อความเครียดในการเปลี่ยนแปลงระบบป้องกันของทางเดินอาหารที่ควบคุมโดยผ่านกลไกผ่านระบบประสาทชนิดตัวรับความรู้สึกเบื้องต้น

ชื่อนักวิจัย : รศ.สพ.ญ.ดร. สุธาสินี ปุณณโชติ
ภาควิชาสรีรวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : sutthasinee@gmail.com

ระยะเวลาของโครงการ : 31 สิงหาคม 2547 – 30 สิงหาคม 2550

ความเครียดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆในร่างกายเนื่องจากทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์เพื่อให้ร่างกายสามารถตอบสนองต่อความเครียดที่มีช่วงระยะเวลานานระบบประสาทชนิดโอปิออยด์ที่ปรากฏในระบบประสาทชนิดรับความรู้สึกมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการหลั่งสารสื่อประสาทจากระบบประสาททุกชนิดรวมทั้งระบบประสาทของทางเดินอาหาร (ENS) ระบบทางปกป้องของทางเดินอาหารโดยเฉพาะการเรียงตัวแน่นของเยื่อและ การขับหลั่งสารภูมิคุ้มกัน เป็นการตอบสนองแบบเฉพาะที่ซึ่งถูกควบคุมโดยระบบประสาท ดังนั้นถ้าระบบประสาทมีการเปลี่ยนแปลงจากผลจากความเครียดการทำงานของระบบปกป้องเยื่อทางเดินอาหารอาจเกิดความเสียหายได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบปกป้องเยื่อทางเดินอาหารที่เป็นผลมาจากการควบคุมโดยวงจรการทำงานของระบบประสาทชนิดรับความรู้สึกโดยการค่ากระแสไฟฟ้า (Isc) ค่าความต่างศักย์ (PD) และค่าความต้านทาน (R) ด้วยวิธีอูซซิงโวลต์เดจแคล์มเพื่อใช้เป็นค่าบ่งชี้ของระบบป้องกันเชิงกล และทำการวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA) ด้วยวิธีอิลิซาเพื่อบ่งชี้ระบบขับหลั่งของสารภูมิคุ้มกันชนิดเยื่อเมือก บทบาทของการทำงานของระบบประสาทชนิดรับความรู้สึกที่ควบคุมรีเฟล็กซ์การขับหลั่ง (mucosal reflex) โดยการกระตุ้นด้วย แคปไซซิน (CAP) แคลซิโทนินยีนรีเลทเปปไทด์ (CGRP) ซัสแตนต์ พี (SP) อะซีทิลโคลีน (CCh) และ นอร์เอปิเนฟริน (NE) แสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่า การเพิ่มการทำงานของ SP และ NE ลดการต้านทานและการขับหลั่ง IgA ของเยื่อ สำหรับการทดสอบผลของความเครียดต่อการทำงานของรีเฟล็กซ์นี้โดยการนำหนูพันธุ์ Wistar เพศผู้มาทำให้เกิดความเครียดด้วยการกักขังวันละ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน (acute), 7 วัน (subchronic) และ 14 วัน (chronic) พบว่าค่า R ของเยื่อที่ได้จากหนูที่ได้รับความเครียดระยะยาวมีค่าต่ำสุดและมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ IgA ที่แยกได้จากอุจจาระในลำไส้ต้น (caecal IgA) โดยที่พบอีกว่า mucosal reflex ที่กระตุ้นด้วย CAP ลดลง 70% โดยที่ผลการยับยั้งการขับหลั่งของ m-, d- และ k-OR โดยการกระตุ้นด้วย DAMGO, DSLET และ U-50,488 ลดลง 20-30% ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของผลจาก SP ต่อการทำงานของระบบปกป้องในหนูที่ได้รับความเครียดเรื้อรังเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่าเมื่อทำการให้ DAMGO ก่อนการให้ SP พบว่าการตอบสนองของ SP ต่อการขับหลั่งเพิ่มมากขึ้นถึง 2 เท่า ดังนั้นการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าความเครียดระยะยาวมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการทำงานของ mucosal reflex และ opioidergic system ในระบบประสาททางเดินอาหารซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารในภาวะเครียด

คำหลัก: ความต้านทาน, ตัวรับโอปิออยด์, รีเฟล็กซ์การขับหลั่ง, ระบบประสาทรับความรู้สึก, อิมมูโนโกลบูลิน เอ

Executive Summary

Stress has been known to induce chronic health problem and cause low production in domestic animals. The body response to chronic stress involves in defections of organ systems including gastrointestinal system. The purpose of the present study was to investigate the physiological changes which may indicate the tendency of stress-time-related abnormalities of intestinal defense mechanism. After acclimatization for five days upon the arrival, twenty four male Wistar rats were randomly divided into six groups. Three groups of animals were stressed by immobilization during 10-11 am for 3 (acute stress), 7 (subchronic stress), and 14 days (chronic stress). The other three groups (control groups) were kept in the same environment and time as stress group. At the end of session, the physiological parameters including of hematology and intestinal defense mechanism, i.e. caecal immunoglobulin A and potential different of intestinal mucosa, were measured. Chronic stress rats significantly revealed much change from control groups and other stress groups. Especially, their body weight and feed intake were significantly decreases but the change of adrenal gland size was not observed. Even though, high level of plasma corticosterone which indicates the stress condition were commonly found in all stress rats, only chronic stress rat revealed the neutrophilia and lymphocytopenia. Moreover, the colonic epithelial potential different was lowest (-0.90 ± 0.40 mV/cm², n=4, p<0.05) and caecal immunoglobulin A was highest in chronic group (225 ± 26.6 ng/ml/mg feces, n=4, p<0.01) suggesting the leakage of the intestinal mucosa in chronic stress rats. Therefore, the present study concludes that chronic stress induced intestinal mucosal leakage and may be associated with intestinal abnormality which could be indicated by increasing of plasma corticosterone and caecal immunoglobulin A levels.

Part I. Significance of mucosal reflex and its neurotransmitters in regulating the electrolyte transport on immunoglobulin A secretion from colonic epithelium of the Wistar rat

Gastrointestinal host defense is locally controlled by enteric nervous system. The neurotransmitters of enteric nervous system play important roles to modulate the intestinal defense mechanism especially mechanical defenses such as tightening of epithelium, motility and secretion. This study aimed to investigate the regulation of these mechanical defense mechanisms by the involved enteric neural circuitry which is stimulated and mediated by capsaicin (CAP) and calcitonin gene related-peptides (CGRP), substance P (SP), acetylcholine (CCh) or norepinephrine (NE), respectively. In this study, we used isolated colonic epithelial tissues of Wistar rat to measure mucosal short circuit current (Isc), potential difference (PD) and tissue resistance (R) using Ussing-voltage clamp technique to identify the intestinal mechanical defense. Additionally, we examined changes in the immunoglobulin A (IgA) secretion using ELISA to indicate the secretory property involved in mucosal immunity function. The results revealed that at the concentration of 1 μ M, CGRP, SP and CCh increased Isc by >50% ($P<0.05$) while NE decreased Isc by 40%. In addition, all drugs tested in the present study except CGRP decreased the mucosal IgA. Even though, most of drug effects did increase the Isc. Interestingly, SP also decreased tissue resistance by 25% ($P<0.05$). Therefore the results of this study suggest that stimulation of neural secretory reflex or applying its neurotransmitters especially CAP, SP CCh or NE to regulate the electrolyte transport may alter intestinal host defense mechanism especially tissue resistance and IgA secretion. And the changes of IgA secretion may have specific pathway which could not be predicted by the change of electrolyte and water transport.

Materials and methods

Chemicals. Calcitonin gene related peptides (human 8-37), Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), Carbachol, Norepinephrine, Substance P and protease inhibitor cocktail were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All chemicals were made in aliquots and kept at -20 C before use. Some chemicals were dissolved in methanol, the final methanol concentration of which was less than 0.1% (vol/vol).

Animals. Male Wistar rats (250-300 g) were obtained from National Animal Center, Mahidol University, Thailand. They were housed in stainless-steel cages in a room with a 12-12 hour light:dark cycle and allowed free access to food and water. All animals experimental protocol were approved by the Experimentation Animal Ethic Committees, the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

For experiment, rats were sacrificed with small animal decapitator (Harward, Kent, UK). After a laparotomy incision, the whole colon was removed, rinsed and placed in an ice-cold oxygenated Ringer solution (composition in mM: 118 NaCl, 4.7

KCl, 2.5 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1.0 NaH₂PO₄, 11 D-Glucose; pH 7.4). The colon was longitudinally cut close to the mesentery and the serosal muscle layers were carefully stripped away by blunt dissection to obtain a mucosa-submucosal preparation. The appearance of palm-like foldings was used to distinguish between the distal and proximal colon.

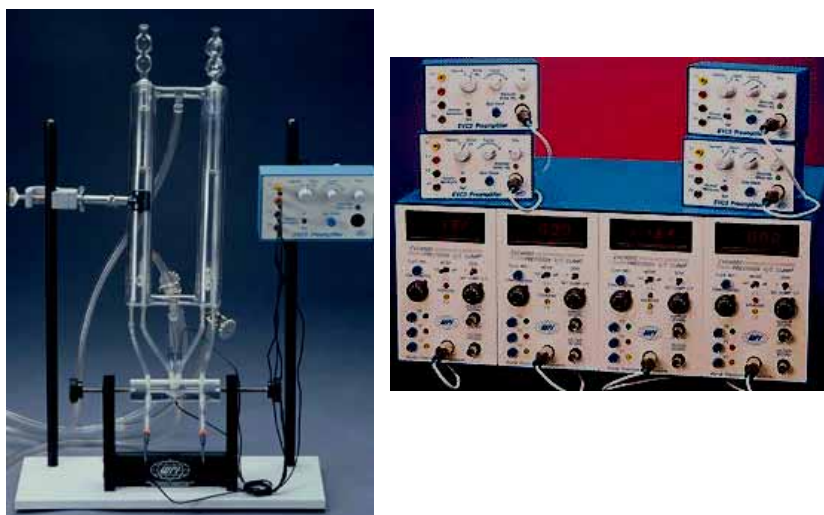


Figure 1 Photograph represents (Left) Ussing chamber and (Right) voltage clamp

Measurement of electrical parameters. The mucosa-submucosal preparation was mounted in Ussing chambers (0.62 cm²) (Fig. 1) bathed on the apical and basolateral sides with identical Ringer's solutions at 37° C and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. Transepithelial potential difference (PD) and short circuit current (I_{sc}) were measured with the use of voltage-clamp amplifier (EVC-4000, World Precision Instrument) using Ag/AgCl₂ electrodes connected to the bathing solution via agar bridges. Tissue conductance (G) was calculated using Ohm's law ($G = I_{sc}/PD$). The tissues were continuously short-circuited, except for a brief interval of open-circuited readings before and after adding any chemicals. The data from the voltage clamp was connected to MacLab 4S A/D converter and recorded with a 400 MHz PowerPc Macintosh. After mounting, the tissues were equilibrated for at least 30 min to achieve a stable I_{sc} before the addition of chemicals. Positive I_{sc} corresponded to the movement of anions from the serosal to mucosal compartments or movement of cations from the mucosal to serosal compartments or a combination of both.

Measurements of IgA levels. The amount of total rat IgA was estimated in the mucosal (apical) and basolateral (serosal) solutions bathing the tissue preparations. To obtain the neurotransmitter effect on secretion of IgA in vitro, the solutions collected to 1.5 microfuge tube coated with protease inhibitor cocktail during a 5 min period prior to addition of drug were used as control. The amount of total IgA was determined by a rat IgA quantitation kit (Bethyl Laboratories, Texas, USA). Briefly, microtitre plates were

coated with 100 μ l of affinity purified goat anti-rat IgA antibody coupled to horseradish peroxidase diluted 1:100 in carbonate buffer pH 9.6 at 4°C overnight. After washing and blocking steps following the standard protocol of enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA), 100 μ l of 1:50 diluted sample were added to each well and incubated for 1 hr at room temperature. After a third washing step, each well received 100 μ l of peroxidase labelled antiserum diluted 1:20,000 in PBS buffer pH 7.2 for 1 hr at room temperature. Color were then developed by 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) substrate for 5 min and stopped by 2N sulfuric acid. Absorbance was read at 450 nm and 550 nm by Thermomax. The amount of IgA was determined from standard curve using a rat IgA.

Data analyses. All values were expressed as means and standard error of mean (SEM), n was the number of different tissue preparations and N was the number of animals in each experiment. The increase in I_{sc} was quantified by subtracting the peak of an I_{sc} response from its respective baseline value before drug administration. The statistical differences between control and treatment means were analyzed using Student's paired or unpaired t-test when appropriate. The differences among groups were analyzed using a one way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

To study the significance of mucosal reflex to regulate gastrointestinal host defenses, we measured epithelial transport and immunoglobulin A secretion response immediately to capsaicin, CGRP, SP, carbachol and norepinephrine stimulation.

Effects of mucosal reflex and its neurotransmitters on the modulation of colonic epithelial transport

Mucosal short circuit current; mucosal I_{sc}

The measurement of mucosal short circuit current (I_{sc}) were performed by using Ussing chamber and voltage clamp technique. The I_{sc} is therefore the net of ion occurred at the mucosa. In the present study, the average of I_{sc} at the equilibrium of 38 colonic epithelial tissues from 10 rats was $75.90 \pm 10.28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ with the potential difference and tissue epithelial resistance of $-3.35 \pm 1.34 \text{ mV}$ and $68.99 \pm 7.03 \text{ m}\Omega \cdot \text{cm}^2$, respectively. The viability of tissues when their electrical parameter was not equal to zero was determined before drugs test.

In the present study, stimulation of mucosal reflex by serosally but not mucosally added of 8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide or capsaicin (CAP) 30 μM produced transiently increased of I_{sc} from $98.25 \pm 15.28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ to $123.80 \pm 16.25 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Table 1). However, the I_{sc} changes of control colonic epithelium which recorded at the same

period of time (yolk control) excepting drug added revealed spontaneously increased. Therefore, the effects of *Isc* changed in response to capsaicin were not statistically differed from yolk control (Table 1-2 and Fig. 2).

To identify the neurotransmitters of mucosal reflex circuitry mediating the effects, the sensory neuropeptides, calcitonin gene-related peptide (CGRP; 1 μ M) and substance P (SP; 1 μ M), secretory motor neurotransmitters carbachol (CCh; 1 μ M) or sympathetic neurotransmitters norepinephrine (NE; 1 μ M) were examined. Stimulation the colonic epithelium at the serosa with CGRP, SP or CCh increased *Isc* more than 60% (Table 2 and Fig. 2). In contrast, NE decreased mucosal *Isc* by -39.06 ± 2.55 % ($P < 0.01$) (Table 1-2 and Fig. 2). However, all substances administrated to mucosal bathed solution did not reveal any changed even though the higher concentration and prolong duration of recording (>30 min) were attempted.

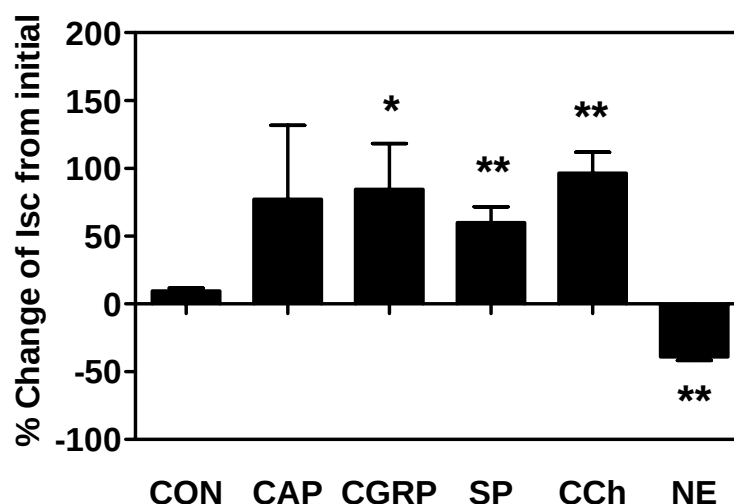


Figure 2 Histogram represents the mean $\pm$ SEM of percent changes of *Isc* response to serosally administration of no substance/vehicle (CON), capsaicin (CAP; 30 μ M), calcitonin gene-related peptide (CGRP; 1 μ M), substance P (SP; 1 μ M), synthetic acetylcholine (carbachol; CCh 1 μ M) or norepinephrine (NE; 1 μ M).

* or ** indicates the statistically significance at $P < 0.05$ or 0.01 , respectively when compared between neurotransmitters vs. CON with student unpaired t-test from $n=3-5$ tissues of $N=8-10$ rats.

Potential difference; PD)

For the change of potential difference of mucosal compared to the serosal side, CGRP and SP significantly induced more negative charge immediately after adding drugs. The CON tissues without drugs showed no alteration of PD ($P < 0.05$, student

paired t-test). However, SP and NE statistically induced decrease of PD by 20.75 ± 6.29 or $52.24 \pm 12.83\%$, respectively (Fig.3 and Table 2).

In addition, NE or capsaicin tended to decrease PD by $-14.09 \pm 1.19\%$ or $-73.34 \pm 29.46\%$, respectively but not showed significantly differences from CON ($p > 0.05$, student unpaired t-test) (Fig.3 and Table 2).

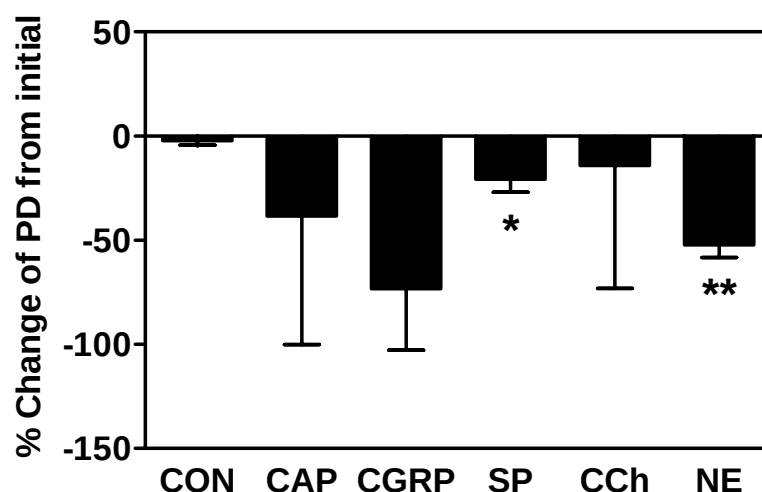


Figure 3 Histogram represents the mean $\pm$ SEM of percent changes of potential differences (PD) response to serosally administration of no substance/vehicle (CON), capsaicin (CAP; 30 μ M), calcitonin gene-related peptide (CGRP; 1 μ M), substance P (SP; 1 μ M), synthetic acetylcholine (carbachol; CCh 1 μ M) or norepinephrine (NE; 1 μ M).

* or ** indicates the statistically significance at $P < 0.05$ or 0.01 , respectively when compared between neurotransmitters vs. CON with student unpaired t-test from $n=3-5$ tissues of $N=8-10$ rats.

Tissue Epithelial Resistance; TER

To study the tissue epithelial resistance which could be calculated using Ohm's law, the current study showed that serosally addition of SP produced the decrease TER comparing to before drug added. In the CON which is the yoke control was also revealed a little decrease of TER by $4.13 \pm 5.32\%$ over the same period of time (15-20 min). However, the percent decrease of TER response to SP from initial was $-25.02 \pm 1.70\%$ which showed significantly difference from CON ($P < 0.05$). In addition, NE seemed to decrease TER by $-25.69 \pm 8.69\%$ ($P = 0.050$, student unpaired t-test) (Fig. 4 and Table 2).

In contrast, other neurotransmitters tested in this study, CAP, CGRP or CCh did not reveal any affect to TER numbers.

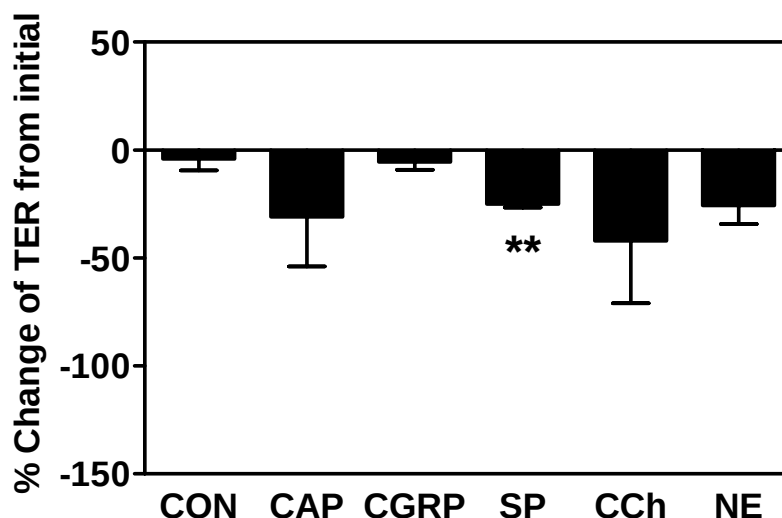


Figure 3 Histogram represents the mean $\pm$ SEM of percent changes of tissue epithelial resistance (TER) response to serosally administration of no substance/vehicle (CON), capsaicin (CAP; 30 μ M), calcitonin gene-related peptide (CGRP; 1 μ M), substance P (SP; 1 μ M), synthetic acetylcholine (carbachol; CCh 1 μ M) or norepinephrine (NE; 1 μ M).

** indicates the statistically significance at $P < 0.05$ or 0.01 , respectively when compared between neurotransmitters vs. CON with student unpaired t-test from $n = 3-5$ tissues of $N = 8-10$ rats.

Effects of mucosal reflex and its neurotransmitters on the modulation of colonic immunoglobulin A secretion

To measure the effect of mucosal reflex and its neurotransmitter in modulating the secretory function of mucosal immunity, we measured the concentration of IgA in solution bathed at both mucosa and serosa site before and after drugs add.

The concentration of immunoglobulin A isolated from solution bathed mucosal site of distal colonic epithelia was gradually high depended on time by $105.60 \pm 47.49\%$ (Fig 5A and Table 2). Similarly, increase IgA concentration revealed at the serosal after 15 min. was $279.10 \pm 171.80\%$, however the variation in numbers of IgA concentration was high among 5-8 tissues ($N = 8$ rats) (Fig 5A and Table 2).

In contrast to CON tissue, decrease IgA response to serosally addition of CAP, CGRP, CCh or NE was significantly showed in the percent changes at $-7.42 \pm 6.03\%$, $-34.56 \pm 19.37\%$, $-24.96 \pm 18.24\%$ or $-20.69 \pm 11.30\%$, respectively ($P < 0.05$, student unpaired t-test compared to CON) (Fig 5A and Table 2). In stead, CGRP increased

secretion of mucosal IgA by $49.53 \pm 51.06\%$ which nearly to the change of IgA secretion in CON tissues ($P > 0.05$) (Fig 5A and Table 2).

In the present study, IgA concentration isolated from the solution bathed at the serosal side were not revealed differences after drug tested for 15 min. ($P > 0.05$, student paired t-test) (Table 1).

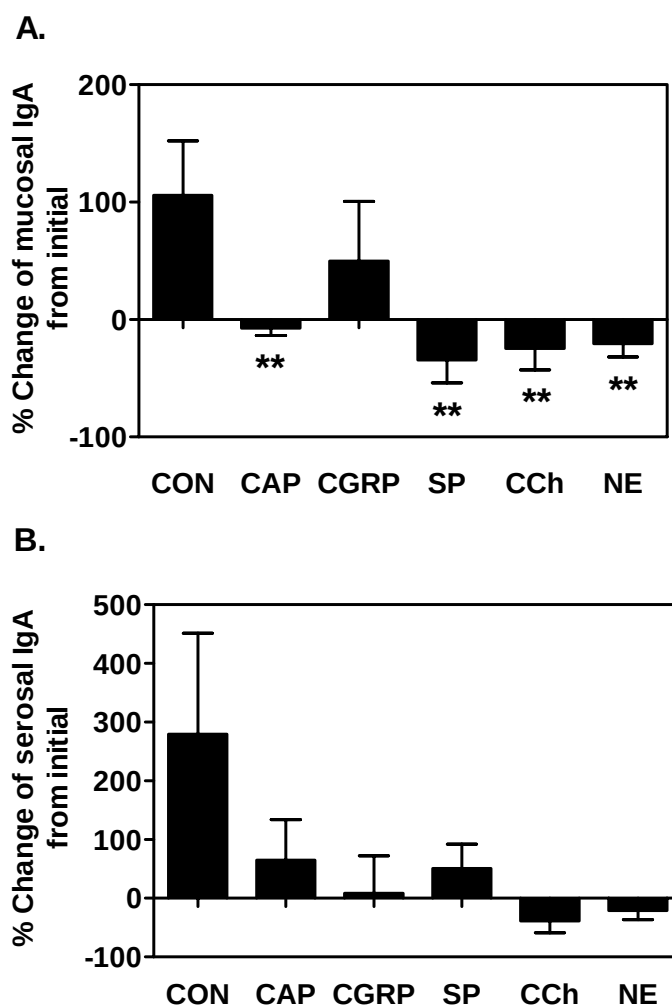


Figure 5 Histogram represents the mean $\pm$ SEM of percent changes of mucosal immunoglobulin A (IgA) secretion response to serosally administration of no substance/vehicle (CON), capsaicin (CAP; 30 μ M), calcitonin gene-related peptide (CGRP; 1 μ M), substance P (SP; 1 μ M), synthetic acetylcholine (carbachol; CCh 1 μ M) or norepinephrine (NE; 1 μ M).

* or ** indicates the statistically significance at $P < 0.05$ or 0.01 , respectively when compared between neurotransmitters vs. CON with student unpaired t-test from $n = 3-5$ tissues of $N = 8-10$ rats.

Table 1 Data represents mean $\pm$ SEM of electrical parameters from Ussing chamber-voltage clamp technique and concentration of mucosal immunoglobulin A of colonic epithelium before and after serosally addition of drugs (n = 5-8 tissues from N=8 rats)

Experiments	Isc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	PD (mV)	R ($\text{m}\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Mucosal IgA (ng/ml)	Serosal IgA (ng/ml)
CON(before)	17.50 $\pm$ 13.36	0.33 $\pm$ 1.06	55.24 $\pm$ 7.57	141.50 $\pm$ 24.64	56.48 $\pm$ 21.70
CON(after)	19.50 $\pm$ 13.44	0.28 $\pm$ 1.06	63.76 $\pm$ 13.77	247.90 $\pm$ 66.60	127.80 $\pm$ 62.74
<i>P value</i>	P = 0.0581	P = 0.1955	P = 0.2389	P = 0.0444	P = 0.1596
CAP(before)	98.25 $\pm$ 15.28	-7.30 $\pm$ 2.84	68.46 $\pm$ 19.75	252.90 $\pm$ 162.60	28.99 $\pm$ 26.15
CAP(after)	123.80 $\pm$ 16.25	-7.58 $\pm$ 1.89	59.95 $\pm$ 13.21	225.10 $\pm$ 157.00	35.03 $\pm$ 21.17
<i>P value</i>	P = 0.0417	P = 0.4141	P = 0.1432	P = 0.1103	P = 0.2246
CGRP(before)	52.67 $\pm$ 8.41	-3.70 $\pm$ 0.62	70.17 $\pm$ 1.75	262.90 $\pm$ 98.21	52.48 $\pm$ 51.40
CGRP(after)	93.00 $\pm$ 9.85	-6.13 $\pm$ 0.58	66.13 $\pm$ 0.89	293.10 $\pm$ 53.58	90.89 $\pm$ 46.08
<i>P value</i>	P = 0.0303	P = 0.0317	P = 0.1266	P = 0.3315	P = 0.2864
SP(before)	72.50 $\pm$ 13.74	-6.25 $\pm$ 1.64	80.25 $\pm$ 12.41	53.18 $\pm$ 18.75	6.88 $\pm$ 6.88
SP(after)	113.30 $\pm$ 21.29	-7.35 $\pm$ 1.89	61.19 $\pm$ 9.91	27.62 $\pm$ 14.48	25.88 $\pm$ 17.74
<i>P value</i>	P = 0.0129	P = 0.0442	P = 0.0035	P = 0.1014	P = 0.1009
CCh(before)	45.20 $\pm$ 15.02	-4.77 $\pm$ 1.36	71.24 $\pm$ 7.39	399.00 $\pm$ 189.80	80.07 $\pm$ 72.51
CCh(after)	90.10 $\pm$ 23.53	-7.67 $\pm$ 2.12	63.47 $\pm$ 4.53	333.00 $\pm$ 83.38	77.25 $\pm$ 27.27
<i>P value</i>	P = 0.0070	P = 0.0524	P = 0.0567	P = 0.3534	P = 0.4831
NE(before)	136.30 $\pm$ 79.79	3.87 $\pm$ 7.64	60.49 $\pm$ 4.25	386.30 $\pm$ 98.66	115.70 $\pm$ 62.39
NE(after)	80.53 $\pm$ 73.35	-5.57 $\pm$ 5.22	39.48 $\pm$ 20.78	296.60 $\pm$ 81.16	73.62 $\pm$ 37.08
<i>P value</i>	P = 0.0738	P = 0.2693	P = 0.2195	P = 0.1113	P = 0.1756

P value is the number from comparison study between before vs. after drug added using Student paired t-test.

Table Data represents mean $\pm$ SEM of percent changes of each value of parameters from Ussing chamber-voltage clamp technique and concentration of mucosal immunoglobulin A of colonic epithelium response to drug (n = 5-8 tissues from N=8 rats)

Experiments	ΔI_{sc} ($\mu A/cm^2$)	ΔPD (mV)	ΔR ($\Omega \cdot cm^2$)	Δ Mucosal IgA (ng/ml)	Δ Serosal IgA (ng/ml)
control (CON)	9.49 $\pm$ 2.10	-2.22 $\pm$ 2.22	-4.13 $\pm$ 5.32	105.60 $\pm$ 46.38	279.10 $\pm$ 171.80
capsaicin (CAP)	77.18 $\pm$ 54.48	-39.92 $\pm$ 47.83	-30.93 $\pm$ 23.07	-7.42 $\pm$ 6.03	64.80 $\pm$ 68.55
<i>P value</i>	0.1709	0.5334	0.1884	0.0096	0.1095
calcitonin gene-related peptide (CGRP)	84.58 $\pm$ 33.54	-73.34 $\pm$ 29.46	-5.59 $\pm$ 3.57	49.53 $\pm$ 51.06	8.00 $\pm$ 64.06
<i>P value</i>	0.0446	0.0628	0.1830	0.2529	0.0867
substance P (SP)	59.91 $\pm$ 11.65	-20.75 $\pm$ 6.29	-25.02 $\pm$ 1.70	-34.56 $\pm$ 19.37	50.44 $\pm$ 41.54
<i>P value</i>	0.0075	0.0302	0.0018	0.0130	0.0674
carbachol (CCh)	96.39 $\pm$ 15.49	-14.09 $\pm$ 1.19	-42.12 $\pm$ 28.96	-24.96 $\pm$ 18.24	-38.82 $\pm$ 18.92
<i>P value</i>	0.0026	0.3982	0.1332	0.0263	0.2806
norepinephrine (NE)	-39.06 $\pm$ 2.55	-52.24 $\pm$ 12.83	-25.69 $\pm$ 8.69	-20.69 $\pm$ 11.30	-21.06 $\pm$ 15.80
<i>P value</i>	0.0003	0.0013	0.0502	0.0436	0.0518

P value is the number from comparison study between drugs vs. CON tissue using Student unpaired t-test.

Discussion

The present study emphasized on the acute response of GI host defense mechanism especially the mechanical defense mechanism such as tightening of epithelial tissues and mucosal immune-related secretion. This mechanism has been known to locally regulate by the mucosal reflex which consists of enteric nervous system and its effector target. The present study applied the Ussing chamber and voltage clamp technique to measure mucosal short circuit current (mucosal I_{sc}), potential difference (PD) or tissue resistance (R) response to the stimulation of mucosal reflex acutely. Since the acute response of GI defense could be detected, the acute response of mucosal immunity-related secretion of IgA could be investigated in the present study model. Even though, this response was unable to approach in the *in vivo* study, because the route of drug administration could be applied directly to the serosal site. Therefore, the results of mucosal reflex stimulation or neurotransmitter tested were masked by the many systemic effects especially blood circulation and bioactive metabolites.

In the present study, we examined the response of GI defense mechanism to mucosal reflex by applying 8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide (capsaicin 3 μM) to either mucosa or serosa. Mucosally addition of capsaicin did not produce any changes in the electrical parameters of colonic epithelium even though it seems to imitate the natural defense pathway which is stimulated by luminal foreign substances. In contrast, serosally administration seemed to increase I_{sc} but the evidence was similar to the CON tissues. This result is consistent to the study of Yarrow and co-workers (1991) which indicated that stimulation colonic epithelial tissue with 0.1-3 μM increased I_{sc} but repeated with high dose capsaicin inverted the secretory effects. In addition, single administration of capsaicin could not produce change in I_{sc} similar to the result of this study. The possibly explanation of the unresponsive effects of capsaicin may be that the mucosal reflex was unintentionally induced by the stretching during the tissue preparation. Thereby, the exogenous added of capsaicin in the bath solution was similar to the capsaicin repeated dose which produces the unresponsive secretory effects or even the anti-secretory effects.

Focusing on the stimulation effects of I_{sc} , the increase I_{sc} was suggested to mediate by increasing of chloride secretion via the Cl^- channel at the apical membrane of colonic epithelium in rat. The mechanism of mucosal reflex stimulating by the capsaicin have been explained that the capsaicin binds to the vanilloid receptor at the sensory nerve and the sensory nerve was then activated and released the containing neurotransmitters, calcitonin gene related peptides and substance P to stimulate the secretory-motor neurons in the submucosal plexus which further released acetylcholine or 5-HT to stimulate chloride secretion. In addition, capsaicin directly stimulated intestinal epithelial secretion have been possible (Holzer et al., 1990). However, in the previous study and the other research group revealed that pretreatment the tissues with

tetrodotoxin inhibited capsaicin-induced Isc suggesting the secretory motor neurons is the predominant pathway in rat distal colon (Vanner and MacNaughton, 1995; Deachapunya et al., 2006). In addition to the secretory effects, capsaicin stimulates many gastrointestinal effectors such as motility (Takaki and Nakayama, 1989), mucin secretion (Moore et al., 1996) or intestinal blood flow (Akiba et al., 1999; Holzer et al., 1989; Vanner, 1993; Vanner and Surprenant, 1996) which may associate with ion secretion to protect gastrointestinal mucosa. Even though, CAP tended to increase Isc involving the stimulatory effects on chloride secretion, CAP decreased mucosal immunoglobulin A secretion. On the other hand, the inhibitory effect of CAP on IgA secretion was less than effect of SP or CCh whereas CGRP increased mucosal IgA secretion. According to the mechanism of CAP which is mediated by these three neurotransmitters, so the CAP effects would be sum of inhibitory effects of SP and CCh encountered with stimulatory effect of CGRP. The conclude effects of mucosal reflex stimulation by capsaicin is decrease secretion related to mucosal immunity, however the inhibitory effects of mucosal stimulation is less harmful than SP and CCh alone. There are many reports of the significance of mucosal reflex on the GI host defense mechanism. For an example, the chemical denervation of sensory nerve with chronic injection of low dose capsaicin for one week can decrease the severity of enteritis. However, the wound repair and growth of epithelium was loss because of the decrease of CGRP. Therefore, the GI mechanical defense stimulated mucosal reflex would be in balance because of the effects of CGRP. Okajima and Harada (2006) suggested the advantage of CGRP released by the mucosal reflex stimulation induced by high-fiber diets and acidic food is helping in protection, growth and development of intestinal epithelium.

In our study, CGRP was not only maintained IgA secretion whereas the other neurotransmitter of mucosal reflex decreased mucosal IgA secretion, CGRP also kept the tissue epithelial resistance. This evidence supported roles of CGRP in protection of host GI defense mechanism which consistent to in vivo study (Cox et al., 1989). However, substance P which co-released with CGRP during the stimulation of mucosal reflex suppressed most of the host defense especially decreasing of tissue resistant and mucosal IgA secretion. Even though, SP produced the increase of Isc which has been known to involve chloride secretion mediated by the acetylcholine action on intestinal epithelium (McFadden et al., 1986). Therefore, SP effects seemed to impair rather than facilitate the protective function of mucosal intestinal tract. In addition, SP has been known as the potent mast cell degranulator leading to release of many inflammatory mediators (mast cell mediators) such as histamine and prostaglandins (Cooke 1989). One of the possible mechanisms of SP in stimulating ion secretion was mediated by this MMC. Moreover, SP-induced mast cell degranulation was suggested to involve in many chronic diseases including inflammatory bowel disease. This is the reason why denervation of sensory nerve using the long-term capsaicin help to alleviate chronic inflammation.

However, there was no reports about the mechanism of SP on the suppression of IgA secretion and tissue epithelial resistant. Perhaps, MMC released from the mast cell may play roles in this evidence. It was interesting that when studied the effects of CGRP or SP in vivo, perfusion to lumen of jejunum or intravenous injection with the same concentration of CGRP and SP increased IgA secretion. The results of the previous studies was difference from our study since stimulatory effects of CGRP and SP was a systemic action on the vasodilatation leading to increase visceral blood flow (Schmidt et al., 1999). Indeed, the mucosal reflex and neurotransmitters action is local rather than systemic. Therefore, the results of the present study are similar to the natural mucosal reflex induced host defense.

Addition to the neurotransmitters released from enteric nervous system, sympathetic nervous system plays very important roles on the regulation of GI function including GI defense mechanism. Norepinephrine is the major neurotransmitter of sympathetic nerve. It affects the GI function by regulating the activity of neurons resided in submucosal plexus and myenteric plexus where the neural bodies of mucosal reflex circuitry are located on. The effects of NE on the GI function are usually suppression because the inhibitory action on the motor neurons especially cholinergic motor neurons via specific receptor protein α - or β -adrenergic neurons. However, NE directly stimulates visceral blood flow to increase the GI function. Therefore, stimulation of sympathetic activity or administration of norepinephrine systemically sometimes produced increase gastrointestinal function particular in the secretory effects (Carpenter et al., 1998; Carpenter et al., 2004). In isolated colonic mucosal epithelium of rats, NE decreased Isc associated with suppression of IgA secretion. The decrease Isc induced have been indicated as an increase of K^+ (Schultheiss and Diener, 2000). However, there were no relationships between potassium secretion and IgA secretion. Furthermore, NE was indicated to regulate non-adrenergic-non cholinergic neural system (NANC), i.e vasoactive intestinal peptides (VIP) which could be the other possible pathway in suppression IgA secretion since VIP can stimulate proinflammatory cytokines which may affect the tightening of epithelium. Therefore, when the sympathetic is stimulated especially during stress condition, it may be possible that NE will cause suppression of GI defense mechanism leading to the susceptibility of host to be infected by pathogenic microorganisms.

In conclusion, the results of this study suggest that stimulation of neural secretory reflex or applying its neurotransmitters especially CAP, SP CCh or NE to regulate the electrolyte transport may alter intestinal host defense mechanism especially tissue resistance and IgA secretion. And the changes of IgA secretion may have specific pathway which could not be predicted by the change of electrolyte and water transport

References

1. Akiba, Y., Guth, P.H., Engel, E., Nastaskin, I. and Kaunitz, J.D. 1999. Acid-sensing pathways of the rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 277: 268–274.
2. Carpenter, G.H., Garret, J.R., Harley, R.H. and Proctor, G.B. 1998. The influence of nerves on the secretion of immunoglobulin A into submandibular saliva in rats. *J. Physiol.* 512.2: 567-573.
3. Carpenter, G.H., Proctor, G.B., Ebersole, L.E. and Garret, J.R. 2004. Secretion of IgA by rat parotid and submandibular cells in response to autonomic stimulation in vitro. *Int. Immunopharmacol.* 4: 1005-10014.
4. Cooke, H.J. 1989. Role of the little brain in the gut in water and electrolyte homeostasis. *FASEB J.* 138: 127-138.
5. Cox, H.M., Ferrar, J.A. and Cuthbert, A.W. 1989. Effects of alpha- and beta-calcitonin gene-related peptides upon ion transport in rat descending colon. *Br. J. Pharmacol.* 97: 996-998.
6. Holzer, P., Pabst, M. and Lippe, I. 1989. Intragastric capsaicin protects against aspirin-induced lesion formation and bleeding in the rat gastric mucosa. *Gastroenterol.* 96: 1425–1433.
7. Holzer, P., Pabst, M., Lippe, I., Peskar, B., Livingston, E. and Guth, P. 1990. Afferent nerve-mediated protections against deep mucosal damage in the rat. *Gastroenterol.* 98: 838–848.
8. McFadden, D., Zinner, M.J. and Jaffe B.M. 1986. Substance P-induced intestinal secretion of water and electrolytes. *Gut.* 27: 267–272.
9. Moore, B.A., Sharkey, K.A. and Mantle, M. 1996. Role of 5-HT in cholera toxin-induced mucin secretion in the rat small intestine. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 270: 1001–1009.
10. Okajima, K. and Harada, N. 2006. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications. *Curr. Med. Chem.* 13: 2241-2251.
11. Schmidt, L.D., Xie, Y., Lyte, M., Vulchanova, L. and Brown, D.R. 2006. Autonomic neurotransmitters modulate immunoglobulin A secretion in porcine colonic mucosa. *J. Neuroimmunol.* 185: 20-28.
12. Schmidt, P.T., Eriksen, L., Loftager, M., Rasmussen, T.N. and Holst, J.J. 1999. Fast acting nervous regulation of immunoglobulin A secretion from isolated perfused porcine ileum. *Gut.* 45: 679-685.
13. Schultheiss, G. and Diener, M. 2000. Adrenoreceptor-mediated secretion across the rat colonic epithelium. *Eur. J. Pharmacol.* 403: 251-258.
14. Takaki, M. and Nakayama, S. 1989. Effects of capsaicin on myenteric neurons of guinea pig ileum. *Neurosci. Lett.* 105: 125–130.

15. Vanner, S. 1993. Mechanism of action of capsaicin on submucosal arterioles in the guinea pig ileum. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 265: 51–55.
16. Vanner, S. and Surprenant, A. 1996. Neural reflexes controlling intestinal circulation *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 271: 223–230.
17. Vanner, S. and MacNaughton, W.K. 1995. Capsaicin-sensitive afferent nerves activate submucosal secretomotor neurons in the guinea pig ileum. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 269: 203–209.
18. Yarrow, S., Ferrar, J.A. and Cox, H.M. 1991. The effects of capsaicin upon electrogenic ion transport in rat descending colon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 344: 557–563.

Part II: Decreased Colonic Epithelial Tissue Resistance Occurred in Restraint Stress and Related to Colonic Immunoglobulin A Level in Rats

ความเครียดเป็นภาวะที่มีผลเรื้อรังต่อสุขภาพของสัตว์เลี้ยงทำให้ผลผลิตไม่เป็นไปตามเป้าหมาย ในการตอบสนองของร่างกายต่อความเครียดในระยะเวลานานทำให้เกิดความบกพร่องในระบบต่างๆรวมทั้งระบบทางเดินอาหาร การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระบบปกป้องของเยื่อทางเดินอาหารที่สามารถใช้บ่งชี้ถึงแนวโน้มที่จะเกิดความผิดปกติของทางเดินอาหารในช่วงระยะเวลาต่างๆของความเครียด โดยการนำหนูพันธุ์ Wistar เพศผู้จำนวน 24 ตัวแบ่งเป็น 6 กลุ่มๆละ 4 ตัวประกอบด้วย กลุ่มที่ได้รับความเครียด 3 กลุ่มที่ทำให้เกิดความเครียดด้วยการกักขังวันละ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน (ระยะสั้น), 7 วัน (ระยะกึ่งเรื้อรัง) และ 14 วัน (ระยะเรื้อรัง) และกลุ่มควบคุม 3 กลุ่มที่ถูกเลี้ยงดูให้อยู่ระยะเวลาเดียวกันตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการวัดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา ได้แก่ ค่าทางโลหิตวิทยาและการเปลี่ยนแปลงระบบปกป้องทางเดินอาหารโดยเฉพาะปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน เอ ในอุจจาระบริเวณไส้ตัน และค่าความต่างศักย์ทางไฟฟ้าของเยื่อทางเดินอาหาร ในการศึกษาครั้งนี้หนูที่ได้รับความเครียดแบบเรื้อรังมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และ/หรือกลุ่มที่ได้รับความเครียดระยะอื่นๆ โดยเฉพาะมีน้ำหนักตัว และอัตราการกินอาหารลดลง โดยที่ไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงขนาดของต่อมหมวกไต แต่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของตัวบ่งชี้ถึงภาวะเครียด โดยเฉพาะการเพิ่มของนิวโทรฟิลส์ การลดลงของลิพโซไฟท์ และการเพิ่มขึ้นของคอร์ติโคสเตอรอนในพลาสมา นอกจากนี้ยังพบว่าหนูกลุ่มนี้มีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของเยื่อลำไส้ต่ำที่สุด (-0.90 ± 0.40 มิลลิโวลต์ต่อตารางเซนติเมตร, $n=4$, $p<0.05$) และมีปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน เอ ที่แยกได้จากอุจจาระในไส้ตันสูงสุด (225 ± 26.6 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของอุจจาระ, $n=4$, $p<0.01$) เมื่อเทียบกับทุกกลุ่ม ซึ่งแสดงถึงระบบปกป้องที่เยื่อทางเดินอาหารมีการหลวมตัวแล้วยอมให้มีผ่านของสารง่ายขึ้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงสามารถสรุปได้ว่าความเครียดระยะเรื้อรังมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อทางเดินอาหารที่อาจนำมาซึ่งความผิดปกติ โดยสามารถบ่งชี้ได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับพลาสมาคอร์ติโคสเตอรอนร่วมกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน เอ ที่แยกได้จากอุจจาระในลำไส้ใหญ่

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักตั้งแต่ 180-250 กรัม (น้ำหนักเฉลี่ย 205 กรัม) จำนวน 24 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ตำบลศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล โดยนำมาเลี้ยงแยกกรง กรงละ 2 ตัวในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของหน่วยสรีรวิทยา ชั้น 5 อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำอย่างเพียงพอ และทำการเปลี่ยนวัสดุรองนอนให้ทุกวันเว้นวัน โดยก่อนเริ่มทำการทดลองในแต่ละขั้นตอนจะให้สัตว์ได้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในห้องเลี้ยงสัตว์ (acclimatization) เป็นเวลา 5 วัน

2. การทดลอง

2.1 วิธีการทดลอง

หนูขาวจำนวน 24 ตัวถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 4 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมสำหรับระยะสั้น 3 วัน

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ทำให้เกิดภาวะเครียดโดยการกักขังระยะสั้น 3 วัน

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุมสำหรับระยะกึ่งเรื้อรัง 7 วัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ทำให้เกิดภาวะเครียดโดยการกักขังระยะกึ่งเรื้อรัง 7 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมระยะเรื้อรัง 14 วัน

กลุ่มที่ 6 กลุ่มที่ทำให้เกิดภาวะเครียดโดยการกักขังระยะเรื้อรัง 14 วัน

2.2 การวัดการเจริญเติบโตของหนูขาวโดยการชั่งน้ำหนัก และวัดปริมาณอาหารที่กินโดยการชั่งน้ำหนักอาหารที่กินในแต่ละวัน ทุกวันด้วยตาชั่ง และทำการคำนวณหาอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัว (body weight gain) และอัตราการกินอาหารในแต่ละวัน (average daily feed intake) โดยหาจากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักตัว} = \frac{[\text{นน.ตัววันสุดท้าย (กรัม)} - \text{นน.ตัววันแรกของการทดลอง(กรัม)}] \times 100}{\text{นน.ตัววันแรกของการทดลอง (กรัม)}}$$

(% body weight gain)

$$\text{อัตราการกินอาหารในแต่ละวัน (กรัม/วัน/ตัว)} = \frac{\text{นน.รวมอาหารที่กินในแต่ละวัน(กรัม)}}{\text{จำนวนวันที่ทำการทดลอง (วัน) \times จำนวนหนู (ตัว)}}$$

(average daily feed intake)

2.3 การทำให้หนูขาวเกิดความเครียดด้วยวิธีกักขังแบบระยะสั้น (acute immobilization stress) ระยะกึ่งเรื้อรัง (subacute immobilization stress) หรือระยะเรื้อรัง (chronic immobilization stress) โดยการบังคับหนูขาวให้อยู่ในอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับบังคับสัตว์ที่ถูกต้องตามหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง (rodent restrainer) ทำด้วยพลาสติกที่มีขนาดพอดีกับตัวสัตว์และมีรูเปิดบริเวณจมูกเพื่อให้สัตว์หายใจได้ โดยในการทดลองจะบังคับให้หนูขาวอยู่ในอุปกรณ์ตามวิธีของ Retana-Márquez และคณะ (2003) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ระหว่างเวลา 10.00-11.00 น.) ทุกวันเป็นเวลาติดต่อกัน 3 วัน 7 วัน หรือ 14 วัน ตามลำดับ

2.4 การทำลายสัตว์โดยนำหนูขาวมาทำให้สลบด้วยก๊าซฮาโลเทน (halothane) เมื่อสลบแล้วจึงทำการเปิดช่องอกเพื่อเจาะเลือดจากหัวใจปริมาณ 5 มิลลิลิตรในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA เพื่อนำมาศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา จากนั้นเปิดผ่าช่องท้องเพื่อทำการตัดเก็บต่อมหมวกไต และทำการเก็บลำไส้ส่วนไส้ตัน (caecum) และลำไส้ใหญ่ (colon) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.5 การหาค่ามวลของต่อมหมวกไตเทียบกับน้ำหนักตัว (adrenal gland mass index) นำต่อมหมวกไตที่ตัดเก็บได้หนูขาวจากข้อ 3.4 ทั้งสองข้างมาละลายแยกไขมันที่หุ้มล้อมรอบออก แล้วนำไปชั่งน้ำหนักรวมของต่อมหมวกไตทั้งสองข้างเพื่อให้ได้ค่าบ่งชี้มวลของต่อมหมวกไตตามสูตรดังนี้

$$\text{Adrenal gland mass index} = \frac{\text{น้ำหนักของต่อมหมวกไตทั้งสองข้าง (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวของหนู (กรัม)}}$$

2.6 การวัดปริมาณของ immunoglobulin A ในไส้ตัน (cecal IgA) ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ทำได้โดยการเก็บอุจจาระตัวอย่างที่เก็บได้จากบริเวณ ileocaecal junction ในหลอด microfuge tube แล้วนำไปแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาวัด ทำการแยก IgA ตามวิธีของ Eriksson และคณะในปี 2004 และ Hua และคณะในปี 2001 และ Pihl และ Hua ในปี 2003 โดยการนำอุจจาระเก็บไว้ปริมาณ 100 กรัมมาละลายด้วย phosphate buffer solution (PBS) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ที่มี protease inhibitor (leupeptin, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, aprotinin, 50 ไมโครโมลาร์ ของ PMSF และ 5 ไมโครโมลาร์ของ Bestatin®) ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อป้องกันการทำลายของ IgA จากเอนไซม์จากทางเดินอาหาร เขย่าให้เข้ากันดี แล้วทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกเก็บส่วนสารละลายแล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ทำการวัด IgA ที่แยกได้เทียบกับสาร IgA มาตรฐานตามวิธีที่แนะนำจากผู้ผลิต อ่านค่าการทดลองที่ได้ด้วยเครื่องสำหรับตรวจอ่าน ELISA (Tecan Sunrise Absorbance plate reader, Phenix research product, Hayward, California, USA) ที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่มีความยาว 450 นาโนเมตร และที่ 620 นาโนเมตร (สำหรับค่าของ non-specific background) แล้วทำค่าที่อ่านได้ที่ 450 มาหักลบด้วยค่าที่อ่านได้ที่ 620 นาโนเมตร ค่าที่คำนวณได้จะถูกนำมาเทียบกับค่าที่อ่านได้จากค่าของ IgA มาตรฐานระหว่าง 7.81-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลการทดลองที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของ IgA จำนวน 2 ค่า (2 replicates) จากตัวอย่างอุจจาระของหนูทดลองแต่ละตัว ผลการทดลองจะแสดงเป็นระดับของค่าเฉลี่ยของ IgA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมของอุจจาระในลำไส้) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบน (standard error of mean; S.E.M.)

2.7 การวัดค่าความต่างศักย์ของเยื่อทางเดินอาหาร (potential difference, PD) นำเนื้อเยื่อทางเดินอาหารบริเวณ colon ที่แยกได้จากข้อ 3.4 มาลอกเอาส่วนที่เป็นกล้ามเนื้อออกแล้วนำมาแผ่ยึดติดกับที่ยึดติดเนื้อเยื่อ (tissue chamber) ซึ่งต่ออยู่กับอุปกรณ์ Ussing chamber และ voltage clamp instrument โดยเนื้อเยื่อจะถูกบ่มอยู่ในอ่างเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีสารละลาย physiological Ringer's solution (ส่วนประกอบเป็นมิลลิโมลาร์: 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1.0 NaH₂PO₄, 11 D-Glucose; pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ในภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์และ 95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเป็นเวลา 20 นาทีจึงทำการวัดค่าความต่างศักย์ (potential difference; PD) ระหว่างสารละลายที่อาบบริเวณส่วนท่อ (luminal side) เปรียบเทียบกับสารละลายที่อาบบริเวณที่ติดกับฐาน

(basolateral side) ด้วยอุปกรณ์ voltage-clamp amplifier (DVC-4000, World Precision Instrument) ที่ต่อเข้ากับเครื่องแปลงสัญญาณทางชีวภาพ MacLab 4S A/D converter และถูกบันทึกด้วย 400 MHz PowerPc Macintosh โดยค่าความต่างศักย์ที่ได้จะแสดงถึงความสามารถของเยื่อบุลำไส้ในการกั้นไม่ให้สารต่างๆ เคลื่อนผ่านระหว่างสองด้านได้ (tightening of epithelium) ซึ่งมีค่าเป็นมิลลิโวลต์ต่อตารางเซนติเมตร

2.8 การหาค่าทางโลหิตวิทยา

นำเลือดที่เก็บได้จากข้อ 3.4 มาศึกษา จำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cells count; เซลล์ต่อไมโครลิตร) จำนวนเม็ดเลือดขาวรวม (total white blood cells count; เซลล์ต่อไมโครลิตร) จำนวนเม็ดเลือดขาวแยกชนิด (differential white blood cells count; เซลล์ต่อไมโครลิตร) จำนวนเกล็ดเลือด (platelet count; ยูนิตต่อมิลลิตร) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume or hematocrit; เปอร์เซ็นต์) ค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (mean corpuscular volume; เฟมโตลิตร (fl)) และปริมาณฮีโมโกลบิน (hemoglobin; กรัมเปอร์เซ็นต์)

3. การวิเคราะห์และประเมินผล

3.1 เสนอผลงานการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M.

3.2 เปรียบเทียบผลการทดลองใช้วิธีการทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลอง (comparison multiple test) ด้วย Newman-Keuls หรือเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ทำให้เกิดความเครียดในช่วงเวลาเดียวกันด้วยวิธี Student t-test ตามความเหมาะสม โดยพิจารณาค่ามีความแตกต่างทางสถิติเมื่อค่า $P < 0.05$ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Prism 3.0 (graphpad software)

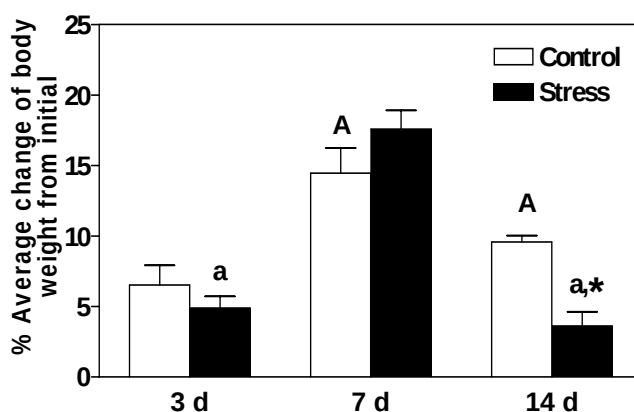
4. ผลการศึกษา

ในการศึกษาบทบาทของความเครียดในระยะต่างๆ คือ ความเครียดระยะสั้น (acute stress, 3 วัน) ความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (subchronic stress, 7 วัน) และความเครียดระยะเรื้อรัง (chronic stress, 14 วัน) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและการทำงานของระบบปกป้องทางเดินอาหารโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดแบบชนิดกักขังในหนูขาวเป็นแบบการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงดังนี้

ผลของระยะเวลาของการได้รับความเครียดต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว

จากการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวระหว่างกลุ่มควบคุมพบว่ากลุ่มควบคุมที่ระยะการทดลอง 3 วัน (6.53 ± 1.40 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ระยะกึ่งเรื้อรังที่ 7 วัน (14.46 ± 1.78 เปอร์เซ็นต์) หรือระยะเรื้อรังที่ 14 วัน (9.57 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดพบว่าส่วนกลุ่มควบคุมระยะเรื้อรัง (9.57 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (3.62 ± 1.0 เปอร์เซ็นต์) ($p < 0.05$)

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มความเครียดด้วยกัน พบว่ามีเฉพาะกลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรังกับมีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มความเครียดระยะเรื้อรังเท่านั้นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่กลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรังมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (3.62 ± 1.00 เปอร์เซ็นต์)



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเฉลี่ย (% Average change of body weight $\pm$ standard error of mean) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3 d) ความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7 d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14 d)

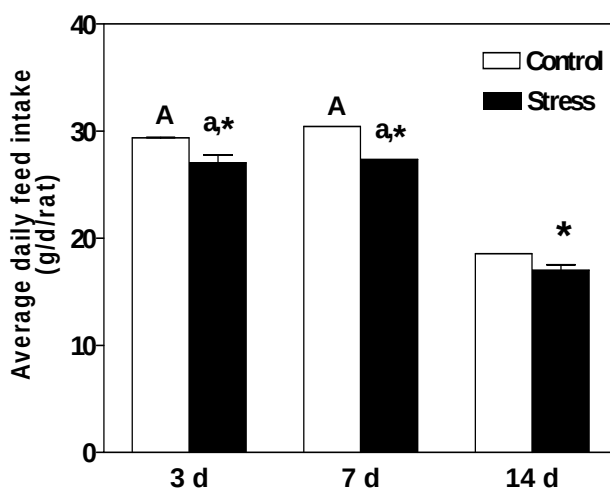
A, ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อแสดงตัวอักษรเหมือนกัน ด้วยการทดสอบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ระยะต่างๆด้วยวิธี ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มควบคุมที่ระยะต่างๆด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test; a, ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อแสดงตัวอักษรเหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มความเครียดที่ระยะต่างๆด้วยวิธี ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test

*, มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดได้รับความเครียดที่ระยะเวลาเดียวกันด้วยวิธี Student unpaired t-test

ผลของระยะเวลาของการได้รับความเครียดต่อพฤติกรรมการกินอาหาร

จากการเปรียบเทียบปริมาณการกินอาหารโดยการวัดอัตราการกินอาหารในแต่ละวัน (average daily feed intake) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 2 และตารางที่ 1) ระหว่างกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงดูที่ระยะต่างๆกัน โดยที่กลุ่มควบคุมระยะกึ่งเรื้อรัง ($30.43 \pm 1.35 \times 10^{-6}$ กรัม) มีปริมาณการกินอาหารมากกว่ากลุ่มควบคุมระยะสั้น (29.37 ± 0.03 กรัม) และกลุ่มควบคุมระยะสั้นมีปริมาณการกินอาหารมากกว่ากลุ่มควบคุมระยะเรื้อรัง (18.55 ± 0.00 กรัม) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มความเครียดกับกลุ่มควบคุม พบว่าทุกกลุ่มมีปริมาณการกินอาหารในแต่ละวันแตกต่างจากกลุ่มควบคุมกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่กลุ่มความเครียดจะมีปริมาณการกินอาหารในแต่ละวันน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับความเครียดด้วยกันพบว่ากลุ่มความเครียดระยะสั้น (27.35 ± 0.73 กรัม)

แตกต่างจากกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (17.01 ± 0.51 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกันกับกลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง ($27.35 \pm 1.35 \times 10^{-6}$ กรัม) ที่แตกต่างจากกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่ากลุ่มความเครียดระยะสั้นไม่มีปริมาณการกินอาหารแตกต่างจากกลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)



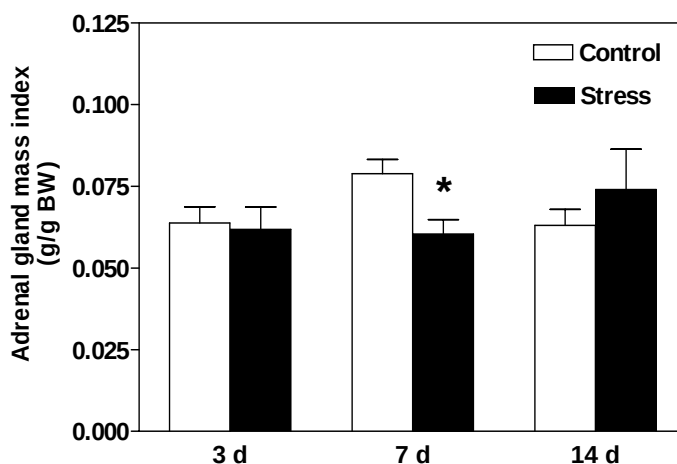
รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงปริมาณเฉลี่ยอัตราการกินอาหารในแต่ละวัน (Average daily feed intake) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3 d) ความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7 d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14 d)

A, ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อแสดงตัวอักษรเหมือนกัน ด้วยการทดสอบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ระยะต่างๆด้วยวิธี ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มควบคุมที่ระยะต่างๆด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test; a, ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อแสดงตัวอักษรเหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มความเครียดที่ระยะต่างๆด้วยวิธี ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test

*, มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดได้รับความเครียดที่ระยะเวลาเดียวกันด้วยวิธี Student unpaired t-test

ผลของระยะเวลาของการได้รับความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของต่อมหมวกไต

ในการศึกษาผลของความเครียดต่อการเพิ่มขนาดของขนาดต่อมหมวกไตซึ่งเป็นกลไกซึ่งพบโดยทั่วไปของการแสดงสภาวะเครียด ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าขนาดของต่อมหมวกไตซึ่งประเมินจากน้ำหนักเฉลี่ยของต่อมหมวกไต (adrenal gland mass index) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลา 3, 7 และ 14 วัน ในระหว่างกลุ่มควบคุม หรือเปรียบเทียบในระหว่างกลุ่มทดลองที่ได้รับความเครียด ($p > 0.05$) (รูปที่ 3 และตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มควบคุมระยะกึ่งเรื้อรังที่ 7 วันมีน้ำหนักของต่อมหมวกไตเฉลี่ยเท่ากับ 0.079 ± 0.004 กรัมต่อกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งมากกว่าน้ำหนักของต่อมหมวกไตของหนูที่ได้รับเครียดระยะกึ่งเรื้อรังที่ระยะเวลาเดียวกัน 0.060 ± 0.004 กรัมต่อกรัมน้ำหนักตัว ($p < 0.05$) (รูปที่ 3 และตารางที่ 1)



รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักต่อมหมวกไตเทียบกับน้ำหนักตัว (Adrenal gland mass index) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3 d) ความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7 d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14 d)

*, มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดได้รับความเครียดที่ระยะเวลาเดียวกันด้วยวิธี Student unpaired t-test

เมื่อเปรียบเทียบระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอรอนกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดพบว่าทุกกลุ่ม (ตารางที่ 1) มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมจะมีระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอรอนน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับความเครียดเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาเดียวกันถึง 50-100 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับความเครียดทั้งสามกลุ่มพบว่าทุกกลุ่มมีระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอรอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยกเว้นกลุ่มความเครียดระยะสั้น (707.9 ± 40.89 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม) และกลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (672.1 ± 63.63 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม) ที่มีระดับสูงเท่าๆกัน ($p > 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับความเครียดทั้งสองกลุ่มมีระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอรอนสูงมากกว่ากลุ่มความเครียดระยะเรื้อรังถึง 2 เท่า

การเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆ

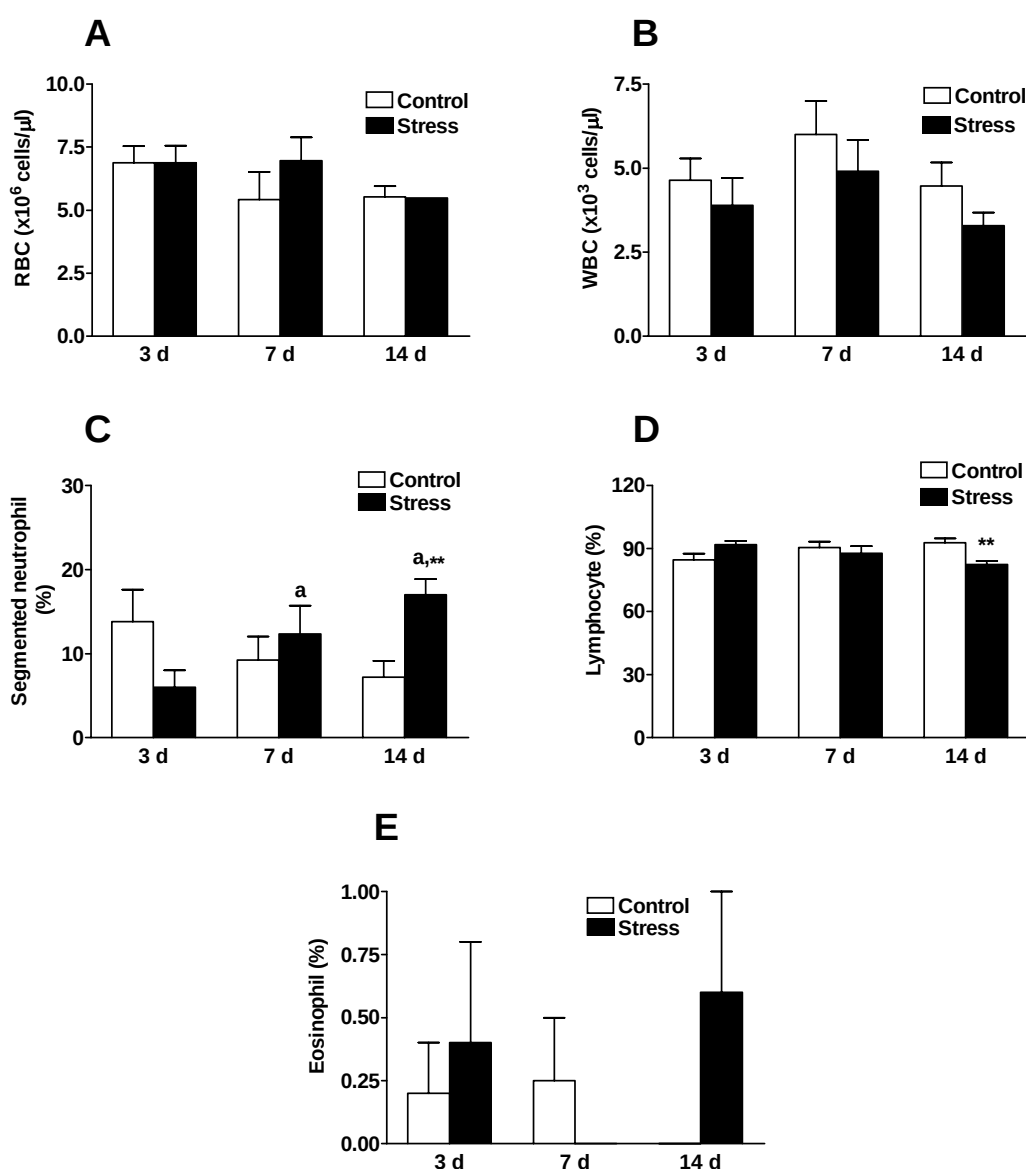
จำนวนเม็ดเลือดแดง (Total red blood cell count) และจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total white blood cell count) จากการศึกษาผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดง และจำนวนเม็ดเลือดขาวพบว่ากลุ่มควบคุมเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cell) พบว่าทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม หรือระหว่างกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆ ($p > 0.05$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ระยะเวลาเดียวกันก็ไม่พบมีความแตกต่างกันของจำนวนเม็ดเลือดแดง ($p > 0.05$) เช่นกัน (รูปที่ 4A, 4B และตารางที่ 1)

จำนวนเม็ดเลือดขาวแยกชนิด (Differential white blood cells)

นิวโทรฟิลล์ (Segmented neutrophil) ในกลุ่มควบคุมเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (รูปที่ 4C และตารางที่ 1) พบว่าทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับความเครียดทั้งสามกลุ่มพบว่ากลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง และระยะเรื้อรัง มีปริมาณนิวโทรฟิลล์เท่ากับ 12.33 ± 3.37 เปอร์เซ็นต์และ 17.00 ± 1.87 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่ากลุ่มความเครียดระยะสั้น (6.00 ± 2.03 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดแต่ละกลุ่ม พบว่าที่ระยะเวลา 14 วันกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรังมีจำนวนนิวโทรฟิลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยที่กลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (17.00 ± 1.87 เปอร์เซ็นต์) จะมีปริมาณนิวโทรฟิลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมระยะเรื้อรัง (7.20 ± 1.93 เปอร์เซ็นต์)

ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (รูปที่ 4D และตารางที่ 1) พบว่าทุกกลุ่มระหว่างกลุ่มควบคุม หรือระหว่างกลุ่มที่ได้รับความเครียดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ระยะเวลาเดียวกัน พบว่ากลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (82.40 ± 1.57 เปอร์เซ็นต์) มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมระยะเรื้อรัง (92.80 ± 1.93 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยที่กลุ่มความเครียดระยะเรื้อรังจะมีปริมาณลิมโฟไซต์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมระยะเรื้อรัง

โมโนไซต์ (Monocyte) อีโอสิโนฟิลล์ (Eosinophil) และเบโซฟิลล์ (Basophil) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (ตารางที่ 1) อีโอสิโนฟิลล์ (รูปที่ 4E และตารางที่ 1) และเบโซฟิลล์ (ตารางที่ 1) พบว่าทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ระยะเดียวกันหรือเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับความเครียด กลุ่มทดลองทั้งสามกลุ่ม



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดง (A) จำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell) (B) เม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total white blood cell) (C) นิวโทรฟิลล์ (segmented neutrophil) (D) ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และ (E) อีโอสิโนฟิลล์ (eosinophil)

a, ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อแสดงตัวอักษรเหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มความเครียดที่ระยะต่างๆด้วยวิธี ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test

******, มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดได้รับความเครียดที่ระยะเวลาเดียวกันด้วยวิธี Student unpaired t-test

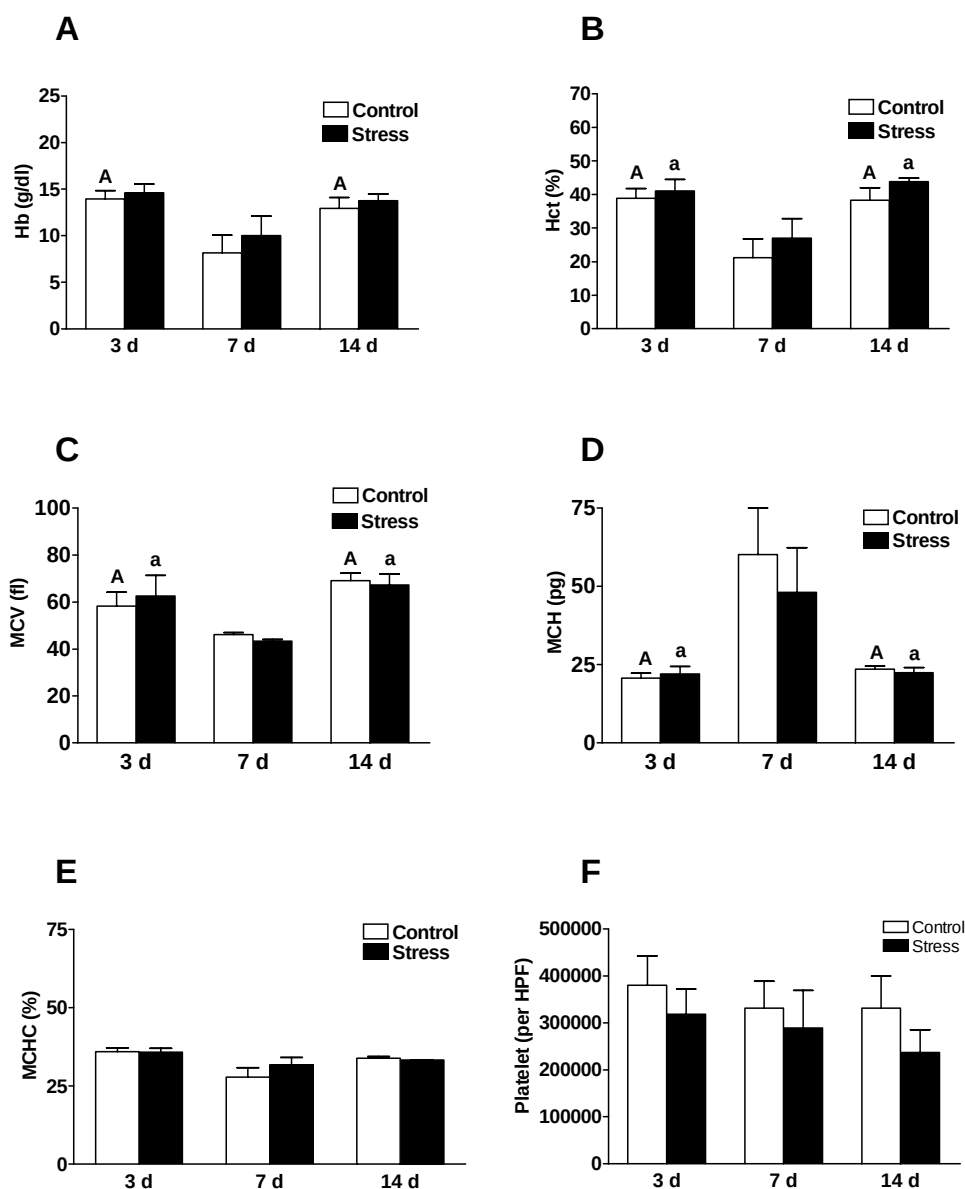
ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) พบว่าระดับของฮีโมโกลบินของหนูกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาสั้นมีปริมาณฮีโมโกลบิน (13.9 ± 0.89 กรัมต่อเดซิลิตร) มากกว่าของหนูกลุ่มควบคุมระยะกึ่งเรื้อรัง (8.16 ± 1.91 กรัม

ต่อเซลล์, $p < 0.05$) (รูปที่ 4E และตารางที่ 1) แต่ปริมาณของฮีโมโกลบินของกลุ่มควบคุมระยะสั้นและกลุ่มควบคุมระยะเรื้อรังกลับไม่มีความแตกต่างกัน และไม่พบความแตกต่างของปริมาณฮีโมโกลบินระหว่างกลุ่มที่ได้รับการความเครียดกับกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกันเช่นกัน

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume) จากการวัดค่าของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นหรือฮีมาโตคริต (Hct) (รูปที่ 4B และตารางที่ 1) พบว่าภายในกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่กลุ่มควบคุมระยะสั้น (38.88 ± 2.89 เปอร์เซ็นต์) มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมากกว่ากลุ่มควบคุมระยะเรื้อรัง (21.18 ± 5.61 เปอร์เซ็นต์) ($p = 0.02$) นอกจากนี้กลุ่มควบคุมระยะเรื้อรังมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นน้อยกว่ากลุ่มควบคุมระยะสั้น (38.24 ± 3.79 เปอร์เซ็นต์) ($p = 0.03$) โดยที่กลุ่มควบคุมระยะสั้นและกลุ่มควบคุมระยะเรื้อรังไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการความเครียดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับการความเครียดพบว่าเฉพาะกลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะเรื้อรัง (27.00 ± 5.84 เปอร์เซ็นต์) กับกลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะสั้น (43.80 ± 1.07 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.03$) โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะเรื้อรังมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะสั้น

ค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (Mean Corpuscular Volume) เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4E และตารางที่ 1) พบว่ามีเพียงกลุ่มควบคุมระยะเรื้อรัง (46.08 ± 0.86 เฟมโตลิตร) กับกลุ่มควบคุมระยะสั้น (69.06 ± 3.21 เฟมโตลิตร) เท่านั้นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) การเปรียบเทียบค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยภายในกลุ่มที่ได้รับการความเครียดพบว่ากลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะเรื้อรัง (43.23 ± 0.82 เฟมโตลิตร) มีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะสั้น (62.54 ± 8.76 เฟมโตลิตร) และกลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะเรื้อรัง (67.20 ± 4.78 เฟมโตลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยของกลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะสั้นกับกลุ่มที่ได้รับการความเครียดระยะเรื้อรังไม่มีความแตกต่างกัน และการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับการความเครียดกับกลุ่มควบคุมก็ไม่มีแตกต่างกันเช่นเดียวกัน

สำหรับค่าการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาอื่นๆ เช่น ปริมาณเกล็ดเลือด (platelets), MCV หรือ MCH นั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญในระหว่างการทดลอง (ตารางที่ 1)



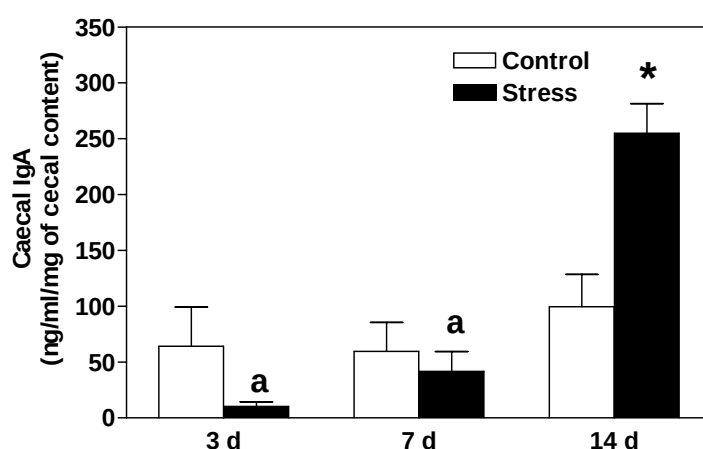
รูปที่ 5 แผนภูมิแสดง (A) ปริมาณฮีโมโกลบิน (hemoglobin) (B) ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume) (C) MCV (D) MCH (E) MCHC และ (F) ปริมาณเกล็ดเลือด (platelet)

A, ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อแสดงตัวอักษรเหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ระยะต่างๆด้วยวิธี ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มควบคุมที่ระยะต่างๆด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test; a, ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อแสดงตัวอักษรเหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มความเครียดที่ระยะต่างๆด้วยวิธี ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test

ผลของระยะเวลาของการได้รับความเครียดต่อระบบปกป้องของทางเดินอาหาร

การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ Immunoglobulin A ในไส้ตัน (caecal IgA)

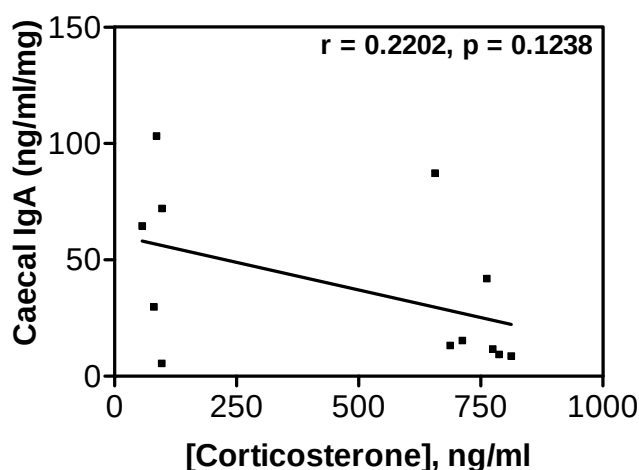
ในการศึกษาวัดปริมาณของ immunoglobulin A ที่แยกได้จากอุจจาระที่อยู่ในไส้ตันพบว่า ระหว่างกลุ่มต่างๆ โดยเฉพาะกลุ่มควบคุมทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) (รูปที่ 6 และตารางที่ 1) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับความเครียดทั้งสามกลุ่มที่ระยะเวลาต่างๆ กับพบว่ากลุ่มที่ได้รับความเครียดระยะเรื้อรังมีปริมาณ caecal IgA สูงถึง 255 ± 26.6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณที่พบในกลุ่มของกลุ่มที่ได้รับความเครียดระยะสั้นและกลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (รูปที่ 6 และตารางที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดพบว่า มีเพียงกลุ่มควบคุมระยะเรื้อรังและกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรังเท่านั้นที่มีความแตกต่างกันโดยที่กลุ่มควบคุมระยะเรื้อรังจะมีปริมาณ caecal IgA เพียง 99.5 ± 29.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงปริมาณ Immunoglobulin A ในไส้ตัน (cecal IgA) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (Control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3 d) ความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7 d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14 d)

a, ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อแสดงตัวอักษรเหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มความเครียดที่ระยะต่างๆ ด้วยวิธี ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆ ด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test

*, มีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียด ได้รับความเครียดที่ระยะเวลาเดียวกันด้วยวิธี Student unpaired t-test



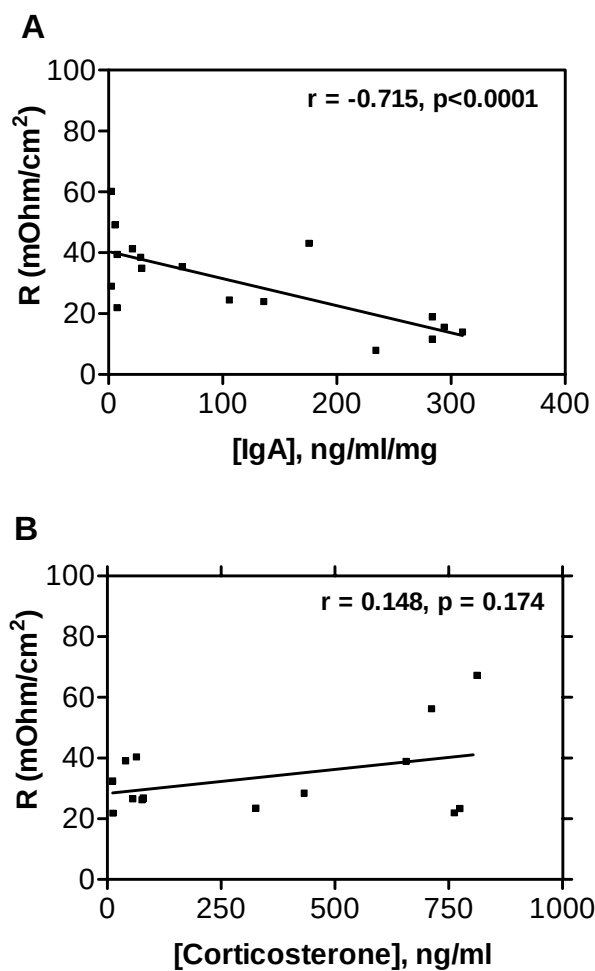
รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า corticosterone (ng/ml) ในพลาสมา กับระดับของ IgA (ng/ml/mg) ในอุจจาระในลำไส้ใหญ่ของหนูขาวที่ใช้ในการทดลองจำนวน 14 ตัว

การเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าของเนื้อเยื่อลำไส้

ในการศึกษาระบบปกป้องของทางเดินอาหารโดยการวัดความต่างศักย์ระหว่างด้าน lumen และด้าน basolateral พบว่ากลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันนั้นมีค่าความต่างศักย์เท่าๆกันในทุกกลุ่ม แต่เปรียบเทียบในระหว่างกลุ่มที่ได้รับบาดเจ็บพบว่าทุกกลุ่มมีความแตกต่างกันโดยที่กลุ่มที่ได้รับบาดเจ็บแบบกึ่งเรื้อรังมีค่าความต่างศักย์เป็นลบมากที่สุด (-16.45 ± 2.90 มิลลิโวลต์ต่อตารางเซนติเมตร) และกลุ่มที่ได้รับบาดเจ็บแบบเรื้อรังจะมีค่าความต่างศักย์เป็นลบน้อยมากที่สุด (-0.90 ± 0.40 มิลลิโวลต์ต่อตารางเซนติเมตร) (ตารางที่ 1) ซึ่งทุกกลุ่มที่ได้รับบาดเจ็บจะมีค่าความต่างศักย์ของเนื้อเยื่อแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน โดยที่กลุ่มความเครียดระยะสั้น (-10.94 ± 1.6 มิลลิโวลต์ต่อตารางเซนติเมตร) และระยะกึ่งเรื้อรังมีค่าความต่างศักย์เป็นลบมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับบาดเจ็บระยะเรื้อรังซึ่งมีค่าความต่างศักย์ของเนื้อเยื่อเป็นลบน้อยมากแม้กระทั่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระยะเดียวกัน ซึ่งค่าดังกล่าวมีความสอดคล้องกับค่าความต้านทานทางไฟฟ้าของเนื้อเยื่อ โดยที่เนื้อเยื่อของสัตว์ที่ได้รับบาดเจ็บแบบเรื้อรังจะมีค่าความต้านทานต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับสัตว์ที่ได้รับบาดเจ็บที่ระยะต่างๆ หรือเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมทุกกลุ่ม (ตารางที่ 1)

ความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าของเนื้อเยื่อลำไส้

เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการลดลงของค่าความต้านทานทางไฟฟ้าต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ caecal IgA หรือ corticosterone พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ corticosterone และ ระดับ caecal IgA มีความสัมพันธ์กันน้อยมากที่ระดับ $r=0.220$, $p=0.1238$ (รูปที่ 7) โดยที่การเปลี่ยนแปลงของค่าความต้านทานทางไฟฟ้าของเนื้อเยื่อนั้นไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ corticosterone ในพลาสมา ($r=0.148$, $p=0.174$) (รูปที่ 8B) แต่เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของความต้านทานทางไฟฟ้าของเนื้อเยื่อต่อระดับ caecal IgA พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ ระดับ caecal IgA ในเนื้อเยื่อเมื่อค่าความต้านทานทางไฟฟ้าเนื้อเยื่อที่ลดลงที่ระดับความสัมพันธ์ $r=-0.715$, $p<0.0001$ (รูปที่ 8A)



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ (A) ค่าเฉลี่ยความต้านทานทางไฟฟ้าของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ กับระดับของ IgA (ng/ml/mg) ในอุจจาระในลำไส้ใหญ่ของหนูขาวจำนวน 20 ตัว และกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ (B) ค่าเฉลี่ยความต้านทานทางไฟฟ้าของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ กับค่า corticosterone (ng/ml) ในพลาสมาของหนูขาวที่ใช้ในการทดลองจำนวน 14 ตัว

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงค่าทางสรีรวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับความเครียด

Parameter	Control	Stress	P value
% Change body weight (%)			
3 d	6.53±1.4	4.88±0.8	p=0.36
7 d	14.46±1.8	17.58±1.3	p=0.19
14 d	9.57±0.5	3.62±1.0	p<0.01
Daily feed intake (g/day)			
3 d	29.37±0.03	27.04±0.73	p=0.033
7 d	30.43±1.3×10 ⁻⁶	27.35±1.3×10 ⁻⁶	p<0.0001
14 d	18.55±0.00	17.01±0.51	NC
Adrenal gland weight (g)			
3 d	0.064±0.005	0.062±0.007	p=0.82
7 d	0.079±0.004	0.060±0.004	p=0.02
14 d	0.063±0.005	0.074±0.012	p=0.57
Corticosterone (ng/ml)			
3 d	60.20±18.48	707.9±40.89	p<0.0001
7 d	60.20±18.48	672.1±63.63	p<0.0001
14 d	60.20±18.48	349.9±81.87	p=0.004
Short circuit currents (mAmp/cm ²)			
3 d	90.52±10.27	143.10±13.75	p=0.019
7 d	84.79±14.69	155.60±19.20	p=0.031
14 d	69.78±10.11	37.70±6.98	p=0.024
Potential different (mV/cm ²)			
3 d	-4.94±0.93	-10.34±1.64	p=0.0054
7 d	-4.11±1.31	-16.45±2.90	p=0.0093
14 d	-2.87±0.42	-0.90±0.40	p=0.0095
Tissue resistance (mOhm/cm ²)			
3 d	46.94±10.15	42.08±9.02	p=0.74
7 d	40.17±9.15	51.18±6.93	p=0.36
14 d	41.12±2.00	20.42±2.29	p=0.04
Ceacal IgA (ng/ml)			
3 d	62.4±35.0	10.3±4.1	p=0.157
7 d	59.6±26.0	41.5±17.9	p=0.568
14 d	99.5±29.0	255±26.6	p=0.009
RBC (×10 ⁶ cells/μl)			
3 d	6.88±0.66	6.88±0.69	p=0.10
7 d	5.41±1.10	6.96±0.93	p=0.32
14 d	5.53±0.43	5.48±0.00	NC
Hb (g/dl)			
3 d	13.94±0.89	41.04±3.47	p=0.64
7 d	8.16±1.91	27.00±5.84	p=0.57
14 d	12.92±1.18	43.80±1.07	p=0.57
Hct (%)			
3 d	38.88±2.89	41.04±3.47	p=0.65
7 d	21.18±5.61	27.00±5.84	p=0.51
14 d	38.24±3.79	43.80±1.07	p=0.20

ตารางที่ 1 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงค่าทางสรีรวิทยาระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับความเครียด

Parameter	Control	Stress	P value
MCV (fl)			
3 d	58.20±5.99	62.54±8.76	p=0.6933
7 d	46.08±0.86	43.23±0.82	p=0.0501
14 d	69.06±3.21	67.20±4.78	p=0.7549
MCH (pg)			
3 d	20.70±1.54	21.98±2.44	p=0.67
7 d	60.15±14.80	48.07±14.25	p=0.59
14 d	23.52±0.95	22.38±1.60	p=0.56
MCHC (%)			
3 d	35.98±0.81	35.80±0.81	p=0.92
7 d	27.85±1.94	31.73±1.58	p=0.33
14 d	33.82±0.38	33.24±0.05	p=0.35
Platelet (per HPF)			
3 d	379,800±62,690	318,200±53,850	p=0.48
7 d	331,500±57,020	289,300±79,950	p=0.71
14 d	331,600±68,310	237,000±48,080	p=0.29
WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)			
3 d	4.64±0.64	3.89±0.82	p=0.49
7 d	6.00±1.00	4.90±0.94	p=0.46
14 d	4.47±0.70	3.29±0.39	p=0.18
Segmented neutrophil (%)			
3 d	13.80±3.79	6.00±2.03	p=0.11
7 d	9.25±2.75	12.33±3.37	p=0.53
14 d	7.20±1.93	17.00±1.87	p=0.007
Band (%)			
3 d	0±0.00	0±0.00	NC
7 d	25.00±8.33	16.67±1.45	p=0.49
14 d	0±0.00	0±0.00	NC
Lymphocyte (%)			
3 d	86.00±3.91	91.80±1.86	p=0.21
7 d	90.50±2.72	87.67±3.37	p=0.57
14 d	92.80±1.93	82.40±1.57	p=0.003
Eosinophil (%)			
3 d	0.20±0.20	0.40±0.40	p=0.67
7 d	0.25±0.25	0±0.00	NC
14 d	0±0.00	0.60±0.40	NC
Basophil (%)			
3 d	0±0.00	0±0.00	NC
7 d	0±0.00	0±0.00	NC
14 d	0±0.00	0±0.00	NC
Monocyte (%)			
3 d	0±0.00	0±0.00	NC
7 d	0±0.00	0±0.00	NC
14 d	0±0.00	0±0.00	NC

ค่า P value แสดงค่าที่การเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Student unpaired t-test ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ระยะเวลาเดียวกัน, NC = not calculated เนื่องจากโปรแกรมไม่สามารถประมวลผลได้

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของร่างกาย ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงที่ระบบป้องกันของทางเดินอาหาร จากการที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างกัน คือที่ระยะสั้น ระยะกึ่งเรื้อรัง และระยะเรื้อรัง ซึ่งใช้แบบการทดลองเหนี่ยวนำทำให้สัตว์เกิดความเครียดจากจิตใจโดยใช้วิธีการกักขัง (immobilization) ในหนูขาว จากการศึกษาผลของความเครียดในระยะต่างๆ พบว่าหนูที่ผ่านการทดลองไม่มีการตายหรือแสดงอาการผิดปกติอย่างเด่นชัด เช่น ไม่แสดงอาการป่วย หรือมีความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร หนูทุกกลุ่มทั้งกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับความเครียดจะมีลักษณะภายนอกไม่แตกต่างกัน ไม่มีอาการดินรน หรือส่งเสียงร้องใดๆ ที่แสดงถึงความเจ็บปวดซึ่งสอดคล้องกับรายงานของแบบการศึกษานี้ว่าเป็นการเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดความเครียดในด้านจิตใจ (emotional stress) มากกว่าทางกายภาพ (physical stress) ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จึงน่าจะสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบสอดคล้องกับภาวะความเครียดของสัตว์เลี้ยงที่เกิดจากจิตใจ เช่น สัตว์ที่ถูกกักขัง หรือปล่อยทิ้งให้อยู่ตัวเดียวเป็นเวลานาน เป็นต้น

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าความเครียดที่เกิดจากภาวะทางอารมณ์ (psychological stress) ที่เกิดขึ้นกับร่างกายนั้นทำให้มีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (corticosterone) ออกมาจากต่อมหมวกไตซึ่งเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกาย ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนนี้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความเครียดในคนและสัตว์มานานแล้ว (Eriksson, 2004) โดยความเครียดที่เกิดขึ้นจะผ่านกลไกการกระตุ้นจากสมองผ่านระบบ hypothalamic-pituitary-adrenal gland axis (HPA) โดยความเครียดที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ในสมองจะทำให้เกิดการหลั่ง corticotrophin-releasing hormone (CRH) ไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ให้หลั่ง adrenocorticotropin-releasing hormone (ACTH) ซึ่ง ACTH จะผ่านกระแสโลหิตไปที่ต่อมหมวกไต (adrenal gland) ทำให้มีการหลั่ง corticosterone ออกมา (Tsiogios et al., 2004) ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการศึกษาในครั้งนี้คือ ในช่วงของความเครียดระยะสั้น 3 วัน (acute stress) และความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง 7 วัน (subchronic stress) แต่เมื่อทำการศึกษาค้นคว้าผลของความเครียดระยะเรื้อรัง 14 (chronic stress) กลับพบว่าปริมาณ corticosterone กลับลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะการกระตุ้นต่อมหมวกไตเป็นเวลานานอาจส่งผลให้เกิด negative feedback กลับไปยังที่ต่อมใต้สมองให้ลดการสร้าง corticosterone หรือเป็นไปได้ว่าการกระตุ้นการสร้าง corticosterone ที่ต่อมหมวกไตอย่างหนัก ส่งผลต่อต่อมหมวกไต โดยต่อมอาจเกิดการล้าหรือความเสียหายได้ จึงไม่สามารถสร้าง corticosterone ได้ออกมาสูงเท่ากับในภาวะที่เกิดความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง และในการที่ในระยะสั้นนั้นมีค่าของ corticosterone สูงสุดเนื่องจากในการเกิดความเครียดระยะแรกๆ นั้น มีการกระตุ้นระบบการหมุนเวียนโลหิตผ่านทางระบบประสาทซิมพาเทติกด้วย จึงทำให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมนออกมาเป็นจำนวนมาก แต่ในระยะกึ่งเรื้อรังนั้นเป็นการกระตุ้นผ่าน HPA เป็นหลักร่วมกับการรักษาสมดุลผ่าน negative feedback (Hashimoyo et al., 1988) ดังนั้นในการทดลองการให้สัตว์ได้รับความเครียดที่ระยะสั้น (ที่ 3 วัน) ระยะกึ่งเรื้อรัง (ที่ 7 วัน) และระยะเรื้อรัง (ที่ 14 วัน) มีความสอดคล้องกับระยะของการตอบสนองของความเครียดของร่างกาย (general stress adaptation; GAS) ที่ระยะ alarm reaction ระยะ resistance และระยะ exhaustion ตามลำดับ

ในการศึกษาขนาดของต่อมหมวกไตซึ่งมักจะมีขนาดใหญ่ขึ้นตอบสนองต่อฮอร์โมน ACTH โดยเป็นผลในการกระตุ้นผ่าน HPA เป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะการเกิดความเครียดจากรายงานการศึกษาในสัตว์หลายชนิด แต่พบว่าการศึกษานี้ยังไม่อาจพบการเปลี่ยนแปลงของขนาดต่อมหมวกไตอย่างมีนัยสำคัญได้ ถึงแม้ว่าขนาด

ของต่อมหมวกไตของหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดมีแนวโน้มว่าจะมีขนาดใหญ่กว่าของกลุ่มควบคุมที่ 14 วัน (รูปที่ 3) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเปลี่ยนแปลงขยายขนาดอาจจะไม่มากนัก หรือไม่ทันที่จะตรวจพบได้ถ้าการหลั่งของฮอร์โมน corticosterone มีปริมาณพอเพียง หรืออาจเป็นไปได้ว่าขั้นตอนการเลาะแยกเนื้อเยื่อต่อมหมวกไต อาจจะไม่ดีพอทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อเยื่อไปบางส่วนได้ ดังนั้นการใช้ตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากการเปลี่ยนแปลงของขนาดต่อมหมวกไต จึงไม่น่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมเท่าใดนัก นอกจากนี้การเพิ่มขนาดของต่อมหมวกไตจากภาวะเครียดแล้วยังอาจเป็นผลมาจากปัจจัยอื่นด้วย เช่น การถูกกระตุ้นด้วย growth hormone ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตได้อีกด้วยซึ่งสอดคล้องกับในการศึกษาครั้งนี้ที่ระยะเวลาที่ 7 วันซึ่งพบว่ากลุ่มควบคุมมีขนาดต่อมหมวกไตที่ขนาดใหญ่ขึ้นโดยไม่มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มของระดับฮอร์โมน corticosterone

การเปลี่ยนแปลงจากความเครียดอีกอย่างหนึ่งที่เห็นได้ชัดเจนจากการทดลองครั้งนี้คือ น้ำหนักตัวที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการกินอาหารในแต่ละวันที่ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสภาวะทางอารมณ์ของหนูที่เกิดความเครียดทำให้ไม่อยากกินอาหาร หรือผลจาก corticosterone ที่กล่าวเอาไว้แล้วข้างต้น โดย corticosterone เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อระบบ metabolism ทำให้เกิด catabolic effect เช่น การเกิดกระบวนการกลูโคเนโอเจเนซิสที่ตับ (hepatic gluconeogenesis) การเกิดการสลายไขมัน (lipolysis) การเกิดการสลายโปรตีนที่อวัยวะต่างๆ (Tsigos et al., 2004) โดยเกิดการเผาผลาญและมีการนำพลังงานไปใช้มากขึ้นส่งผลให้น้ำหนักตัวลดลงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hashimoto และคณะในปี 1988 ที่รายงานไว้ว่าความเครียดในระยะเรื้อรังจะส่งผลให้อัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวลดลง นอกจากนี้ น้ำหนักตัวที่ลดลงอาจมีสาเหตุจากการที่สัตว์ป่วยแต่ไม่สามารถสังเกตเห็นได้จากภายนอก และเป็นผลทำให้สัตว์เกิดการเบื่ออาหารซึ่งอาจต้องทำการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามได้ทำการศึกษาของการเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อทางเดินอาหารเฉพาะส่วนลำไส้ใหญ่เท่านั้น เนื่องจากบริเวณนี้มีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก ร่วมกับเป็นบริเวณที่มีความสัมพันธ์ต่อระบบปกป้องและการขับหลังสารต่างๆรวมทั้ง IgA (Lamm, 1998) นั้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการผ่านเข้าออกของสารน้ำ และอิเล็กโตรไลต์ (รูปที่ 7) อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่าการเปลี่ยนแปลงแบบนี้จะเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนของลำไส้เล็กที่มีความเกี่ยวข้องกับการดูดซึมสารอาหารและมีความสัมพันธ์ในการทำให้เกิดน้ำหนักตัวลดลงหรือไม่

ในการศึกษาผลของความเครียดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเกิดขึ้นในระบบการสร้างเม็ดเลือด และระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Steplewski and Vogel, 1986) โดยพบว่าทำให้เกิดการลดลงของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็นผลมาจากการหลั่ง corticosterone ทำให้มีการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) การเคลื่อนย้าย (migration) และมีผลทำลายเซลล์ (cytotoxicity) เกิดภาวะกดการทำงานของภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) นอกจากนี้การหลั่ง corticosterone ยังทำให้มีการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของฮอร์โมนทำให้เกิดการปลดปล่อยของนิวโทรฟิล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาเกี่ยวกับภาวะเครียดอื่นๆ (Elenkov and Chrousos, 1999) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแบบการศึกษาเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดในครั้งนี้สามารถทำให้สัตว์ทดลองเกิดความเครียดได้จริง ทั้งที่ระยะ 3, 7 และ 14 วันเมื่อพิจารณาการใช้ค่าบ่งชี้ที่เป็นที่ยอมรับในหลักการทางวิทยาศาสตร์ เช่น ระดับ corticosterone การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล หรือการลดลงของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (McPhee, 1999) ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น

เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้ที่มีจุดมุ่งหมายที่ต้องการสำรวจว่า เมื่อสัตว์ที่ได้รับความเครียดที่ระยะเวลานานเท่าใด หรือในช่วงเวลาใดที่ส่งผลต่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดพยาธิสภาพของทางเดินอาหารโดย

เฉพาะที่ระบบปกป้องทางเดินอาหาร ดังนั้นในการศึกษานี้จึงพยายามที่จะใช้การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ IgA ที่แยกจากอุจจาระในลำไส้ต้นมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าสัตรีทดลองได้เกิดมีการเปลี่ยนแปลงที่ระบบทางเดินอาหาร ส่วนปกป้องนี้แล้ว โดยที่ในการศึกษานี้ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างมากของระดับ IgA ในกลุ่มทดลองที่ได้รับความเครียดแบบเรื้อรังถึง 3 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6) ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Eriksson และคณะ (2004) ที่พบว่าในภาวะที่มีความเครียดระยะสั้นนั้นมักไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ IgA ในอุจจาระทั้งๆที่ในระยะการตอบสนองที่ความเครียดระยะ alarm reaction นั้นระบบประสาทซิมพาเทติกจะทำงานเป็นส่วนใหญ่และกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มการขับหลังของสารต่างๆรวมทั้ง IgA ที่ต่อมน้ำลาย mandibular ในสุนัขทดลองด้วย (Kikkawa et al, 2003) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตามจริงแล้วนั้นมีการเพิ่มของการขับหลังเหมือนกับในรายงานอื่น แต่ในขณะเดียวกันนั้นผลของ catecholamines ซึ่งหลั่งออกมาจากปลายประสาทในขณะที่เกิดความเครียดนั้นทำให้เกิดการบีบตัวของลำไส้ลดลงจึงทำให้สิ่งของที่อยู่ในลำไส้มีเวลาสัมผัสกับผนังลำไส้ได้นานขึ้นหรือคือการที่มี transit time ที่เพิ่มขึ้น (Plourde, 1999) ดังนั้นถ้าผนังลำไส้ยังมีคุณสมบัติที่ยังดีอยู่และไม่เสียหายก็จะสามารถที่จะดูดกลับสารต่างๆได้เกือบหมดจึงทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ caecal หรือ fecal IgA เพิ่มขึ้นมาจากปกติ แสดงว่าในการศึกษานี้ที่ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วันนั้นเยื่อของทางเดินอาหารยังไม่มี ความเสียหายเกิดขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาความสามารถของการดูดกลับ หรือขับหลังของเยื่อทางเดินอาหารโดยการวัดความต่างศักย์ทางไฟฟ้าทางด้านท่อลำไส้ (lumen) เทียบกับทางด้านฐาน (basolateral) ซึ่งจะมีค่าต่างศักย์ที่เป็นลบสูงมาก (รูปที่ 7) โดยที่ความต่างศักย์ที่เป็นลบมากขึ้นนั้นหมายถึงการที่อาจจะมีการขับหลังของอออนประจุลบเช่น คลอไรด์ หรือไบคาร์บอเนตอออน ออกไปทางด้าน lumen เพิ่มขึ้น หรือในอีกกรณีหนึ่งนั้นเกิดเนื่องจากการที่มีการดูดกลับของอออนประจุบวก เช่น โซเดียม หรือโพแทสเซียมอออน จากด้าน lumen เพิ่มมากขึ้นได้ แต่ถ้าเกิดเหตุการณ์ทั้งสองอย่างพร้อมกัน ก็จะทำให้ความต่างศักย์นั้นเป็นลบมากขึ้นแต่อย่างไรก็ตามการที่มีความต่างศักย์ของด้าน lumen แตกต่างจากด้าน basolateral มากนั้นย่อมแสดงถึงการยึดติดกันแน่นของเยื่อลำไส้ที่ยังดีอยู่ด้วยจึงจะสามารถทำให้เกิดเหตุการณ์นี้ได้ (Shachar-Hill and Hill, 2002)

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบว่าการเพิ่มของระดับ IgA ในภาวะที่มีความเครียดแบบเรื้อรังเป็นอย่างมากซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาในคนที่พบในปัจจุบันของ Phillips และคณะ (2006) ว่าภาวะความเครียดแบบเรื้อรังทำให้มีปริมาณของ sIgA ที่วัดได้ในน้ำลายลดลง ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการศึกษามากมายการเพิ่มขึ้นของระดับในพลาสมา IgA โดยเฉพาะที่มีการกระตุ้นจาก immunogens (Bosch et al., 2002) อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มขึ้นของการสร้าง IgA จากพลาสมาเซลล์ (plasma cell) หรือมีการเคลื่อนที่ของ IgA มาที่ บริเวณเยื่อเมือกมากขึ้นแต่ก็ไม่ได้เป็นผลทำให้เกิดการขับหลังของ polymeric IgA ไปสู่บริเวณเยื่อเมือกมากขึ้น การที่จะมีการขับหลังของ IgA หรือที่เรียกว่า sIgA นั้นต้องการกระบวนการขนส่งผ่านเซลล์เยื่อ (transcytosis) โดยอาศัยตัวรับ pIgR ที่จะสร้างขึ้นจากเซลล์ของเยื่อบุลำไส้ (enterocytes) สำหรับที่จะส่งผ่าน polymeric IgA ออกไปอยู่ในรูปของ secretory IgA ที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญที่เรียกว่า secretory component ที่มีความสำคัญในการที่จะทำให้ polymeric IgA มีความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ (Lamm, 1998) ดังนั้นในการที่หนูได้รับความเครียดแบบเรื้อรังมีระดับ IgA ที่มากขึ้นในขณะที่ความต่างศักย์ของเยื่อทางเดินอาหารมีค่าที่ต่ำมากนั้นอาจจะมีความเกี่ยวข้องกัน โดยที่ค่าของความต่างศักย์ระหว่างด้าน lumen และ basolateral ที่น้อยนั้นหมายถึงการที่เยื่อเกิดการรั่ว (leak) และยอมให้สารต่างๆรวมทั้ง IgA ที่สร้างจากบริเวณเยื่อเมือกและที่ไหลเวียนมาจากระบบไหลเวียนผ่านสู่ด้าน lumen ได้เป็นอิสระ แต่

อย่างไรก็ตามการที่ความเครียดระยะเรื้อรังทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันเยื่อเมือกโดยไม่เกี่ยวข้องกับเหตุผลดังกล่าวแล้วสามารถทำให้เกิดการหลั่ง sIgA เพิ่มขึ้นจริงโดยการวัดปริมาณของ secretory component เพื่อหาสัดส่วนของ sIgA ต่อ IgA ในตัวอย่างอุจจาระก็น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

แต่อย่างไรก็ตามความเครียดมีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อที่ทำหน้าที่เป็นตัวกั้น (barrier) ยอมให้สารอื่นผ่านเข้าออกได้มากขึ้น (increases tissue permeability) สอดคล้องรายงานการศึกษาที่ผ่านมา (Velin et al., 2004) กับการวัดค่าความต่างศักย์ (potential different; PD) ที่เนื้อเยื่อบริเวณลำไส้โดยใช้ Ussing chamber พบว่าความเครียดระยะเรื้อรังจะมีความต่างศักย์บริเวณลำไส้ลดลงทำให้พบปริมาณ IgA ที่บริเวณไส้ตันเพิ่มมากขึ้น อาจเกิดจากผลของ corticosterone ที่หลั่งออกมามีผลทำให้เนื้อเยื่อทางเดินอาหารเกิดความเสียหาย ความสามารถในการผ่านของสารต่างๆ (permeability) เพิ่มมากขึ้น ทำให้สารต่างๆมีการซึมผ่านออก (leak) มาจากบริเวณเนื้อเยื่อลำไส้มายังท่อทางเดินอาหารเป็นจำนวนมากขึ้น ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานของ SÖderholm และ Perdue ในปี 2001 จึงพบ IgA ปริมาณสูงในหนูที่ผ่านความเครียดมาเป็นเวลานาน

ดังนั้นจากการศึกษาผลของความเครียดระยะต่างๆต่อการเปลี่ยนแปลงระบบปกป้องเยื่อทางเดินอาหารในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ความเครียดระยะเรื้อรังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อทางเดินอาหารอย่างมาก โดยพบว่าเยื่อทางเดินอาหารสูญเสีย permeability จากผลของ corticosterone ซึ่งหลั่งออกมาเพิ่มขึ้นจนเกิดการ leak ของ IgA สู่วางเดินอาหาร ซึ่ง IgA เป็นตัวบ่งชี้ว่าเยื่อทางเดินอาหารเกิดความเสียหาย สูญเสียสภาพการป้องกันจากสิ่งแปลกปลอม หรือ เชื้อโรคต่างๆ จากผลการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์ในการอธิบายการเกิดโรคได้หลายอย่าง เช่น การติดเชื้อที่อวัยวะต่างๆในระบบทางเดินอาหารของคนหรือสัตว์ที่มีความเครียดร่วมกับภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

19. Bauer, M.E., Perks, P., Lightman, S.L. and Shanks, N. 2001. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiol. Behav.* 73(4):525-32.
20. Bosch, J.A., Ring, C., de Geus, E.J., Veerman, E.C. and Amerongen, A.V. 2002. Stress and secretory immunity. *Int. Rev. Neurobiol.* 52:213-253.
21. Carpenter, G.H., Proctor, G.B., Ebersole, L.E., and Garret, J.R., 2004. Secretion of IgA by rat parotid and submandibular cells in response to autonomic stimulation in vitro. *Int. immunopharmacol.* 4:1005-1014.
22. Elenkov, I.J. and Chrousos, G.P. 1999. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *T.E.M.* 10(9):359-368.
23. Eriksson, E., Royo, F., Lyberg, K., Carlsson, H. and Hua, J. 2004. Effect of metabolic cage housing on immunoglobulin A and corticosterone excretion in faeces and urine of young male rats. *Exp. Physiol.* 89(4):427-433.
24. Guy, B. Evaluation of events occurring at mucosal surfaces: Techniques used to collect and analyze mucosal secretions and cells. 2002. *Clin. Diag. Lab. Immuno.* 9(4):753-764.

25. Hashimoto, K., Suemaru, S., Takao, T., Sugawara, M., Makino, S. and Ota, Z. 1988. Corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenocortical responses in chronically stressed rats. *Reg. Pep.* 23:117-126.
26. Hecht, G. 1999. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am. J. Physiol.* 277:C351-358.
27. Hua, J., Anderson, E. and Carlsson, H.E. 2001. Development and validation of a sensitive ELISA for quantification of secretory IgA in rat saliva and faeces. *Lab. Anim.* 35:301-306.
28. James, S.P. 1993. The gastrointestinal mucosal immune system. *Dig. Dis.* 11:146-156.
29. Kikkawa, A., Uchida, Y., Nakade, T. and Taguchi, K. 2003 Salivary secretory IgA concentrations in beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 65(6):689-693.
30. Lamm, M.E. 1998. Current concept in mucosal immunity IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 277:G614-617.
31. McPhee S.J. 1999. Disorders of the Adrenal Cortex. In : .) *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine.* McPhee S.J., Lingappa V., Ganong W.F., Lange J. (eds.) 3rd ed. Stamford :Appleton & Lange. 99-123.
32. Morilak, D.A., Barrera, G., Echevarria, D.J., Garcia, A.S., Hernandez, A., Ma, S. and Petre, C.O. 2005. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* 29(8):1214-1224.
33. Mulak, A. and Bonaz, B. 2004. Irritable bowel syndrome: a model of the brain-gut interactions. *Med. Sci. Monit.* 10(4):RA55-62.
34. Perdue, M.H. and MacKay, D.M. 1994. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 267:G151-165.
35. Phillips AC, Carroll D, Evans P, Bosch JA, Clow A, Hucklebridge F, Der G. 2006. Stressful life events are associated with low secretion rates of immunoglobulin A in saliva in the middle aged and elderly. *Brain Behav. Immun.* 20(2):191-197.
36. Pihl, L. and Hua, J. 2003. Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats. *Lab. Anim.* 37:166-171.
37. Plourde, V. Stress-induced changes in the gastrointestinal motor system *Can J Gastroenterol.* 1999 Mar;13 Suppl A:26A-31A. Review.
38. Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Názquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez-García, R. and Velázquez-Moctezuma, J. 2003. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes response to acute and chronic stress in rat. *P.N.E.C.* 28:207-227.
39. Shachar-Hill, B. and Hill, A.E. 2002. Paracellular fluid transport by epithelia. *Int. Rev. Cytol.* 215:319-350.
40. Söderholm, J.D. and Perdue, M.H. 2001. Stress and the gastrointestinal tract II. Stress and intestinal barrier function. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 280:G7-G13.

41. Steplewski, Z. and Vogel, W.H. 1986. Total leukocytes, T cell subpopulation and natural killer (NK) cell activity in rats exposed to restraint stress. *Lif. Sci.* 38:2419-2427.
42. Tsigos, C., Kyrou, I. and Chrousos, G. 2004. "Stress, endocrine physiology and pathophysiology". [Online] Available:<http://www.endotext.com>.
43. Velin, Å. K., Ericson, A-C., Braaf, Y., Wallon, C. and SÖderholm, J.D. 2004. Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut.* 53:497-500.

Part III Chronic restraint stress modulates effects of mu-opioid agonists and vanilloid capsaicin on ion transport in rat colon

Emotional and immunological stress activates hypothalamic control of neuroendocrine and autonomic responses which are critical to adaptive changes of body functions including mucosal immunity. Chronic stress causing intestinal permeability, bacterial uptake and mast cell hyperplasia exacerbates gastrointestinal disorders such as inflammatory bowel disease and peptic ulcers (Velin et al., 2004). Innervation of intestinal mucosa contributes to multiple immunologic functions that range from induction, activation, effector functions and inactivation to healing including the tonic suppression of mast cell-dependent inflammatory activity (Cooke, 2000). Integrative actions between extrinsic and intrinsic nervous system rapidly and effectively restore homeostasis patterns of intestinal functions that are threatened by stressors. Dysregulation of enteric nervous system such as the activation of secretorymotor function or down regulation of inhibitory function may mediate pathological significance of intestinal chronic inflammation (Wood, 2004). Among the inhibitory neurotransmitters in the enteric nervous system, endogenous opioids enkephalin and endomorphin mediated by μ -opioid receptor plays an important role in stress (degli Uberti et al., 1995; Wigger et al., 1999). Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of chronic stress on submucosal neurons either secretorymotor or inhibitory neurons in regulating ion transport across the colonic epithelium.

Materials and Methods

Animals: Experimental protocol of using thirty male Wistar rats (200-250 g) for three trials were approved by the Experimentation Animal Ethic Committees, the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. After acclimatization for three days in the animal rooms upon the arrival, ten rats for each trial were randomly divided into two groups : CON; subject to handled daily and CRS; subject to chronically immobilized using the rodent restrainer for one hour between 10.00-11.00 am for 14 consecutive days. During the experiment, all rats were kept under pathogen free with a 12:12 hr light:dark cycle and fed on regular laboratory chow and water *ad libitum*. Before each experiment, rat body weight and number of food intake were recorded. On the last day

of stress exposure, rats were immediately anesthetized by isoflurane inhalation and blood sample were collected by cardiac puncture for analysis. Adrenal glands were removed to weight. The whole intestine was removed and kept in ice cold oxygenated physiological solution for ion transport measurement. Caecal contents were evacuated and stored at -20 °C until used.

Caecal Immunoglobulin A (IgA) extraction and measurement: Frozen samples were thawed out and diluted with 0.1% trypsin inhibitor cocktails (1 ml/mg of sample). The mixture was solubilized and centrifuged for 15 min at 8,000 rpm. The supernatant was then collected and determined for the total IgA by enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) using the rat IgA quantitation kit following the manufacturer's instruction (Bethyl Laboratories, Texas, USA). The concentration of IgA in sample was calculated from a standard curve of rat IgA reference and expressed as ng/ml/mg of caecal content.

Ion Transport Measurement: Muscle-stripped distal colonic epithelium was mounted in Ussing chambers bathed with Ringer's solutions at 37°C and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. Transepithelial potential difference (*PD*) and short circuit current (*I_{sc}*) were measured with voltage-clamp amplifier using Ag/AgCl₂ electrodes connected to the bathing solution via agar bridges. The short circuit current (*I_{sc}*) and transepithelial resistance (*R_t*) were determined for ion transport and permeability, respectively.

Statistical analyses: All data were represented as the mean ± S.E.M. *n* was the number of tissue preparations and *N* was the number of rats. Comparisons between control and treatment means were made by student t-test using the PRISM software. A *P* value of 0.05 or less was chosen as statistical significance.

Results

Chronic restraint stress rats revealed significant changes in numbers of differential white blood cells (i.e., neutrophilia and lymphopenia) (Table 1) and increase in adrenal gland size associated with increased total caecal IgA secretion (Fig. 1).

Table1. Effect of chronic restraint stress on some physiological parameters in male Wistar rats

	Control Rat	Chronic-restraint Rat	<i>P</i> value
% Body weight change	22.45 ± 8.48	17.12 ± 6.05	0.25
Feed intake (mg/day)	40.47 ± 2.08	47.63 ± 23.81	0.22
% Adrenal gland weight ratio	0.018 ± 0.0009	0.026 ± 0.0022	0.01
Total caecal IgA (ng/ml/mg caecal content)	140.90 ± 35.08	394.40 ± 3.82	0.0004
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	5.02 ± 0.55	6.16 ± 0.44	0.16
Hematocrit (mg%)	36.50 ± 7.50	42.33 ± 0.88	0.58
WBC (x10 ³ /mm ³)	4.08 ± 0.60	2.71 ± 0.53	0.14
- Neutrophil (%)	5.00 ± 1.00	17.00 ± 3.22	0.02
- Lymphocyte (%)	94.50 ± 1.50	82.33 ± 2.78	0.03
- Eosinophil (%)	0	0.67 ± 0.67	0.42
- Basophil (%)	0	0	-
- Band (%)	0	0	-

Values are represented as mean ± S.E.M. of 15 rats per group taken at the end of experiment from three trials. Differences in group means were considered statistically significant if $p < 0.05$.

In Ussing chamber studies, muscle-stripped colonic segment from chronic restraint stress rat decreased basal I_{sc} and transepithelial resistance by 70% and 34%, respectively, when compared to the control rats ($n=10-20$ tissues, $N=10-15$ rats) (Fig. 2). In the stressed rat colon, the I_{sc} response to serosal treatment with secretagogues, which stimulated neurogenic secretion, vanilloid capsaicin (3 μM), but not cholinergic agonist carbachol (1 μM) or neuropeptide substance P (1 μM), was inhibited by 68% ($n=5-8$ tissues, $N=10$ rats) (Fig. 3). To test whether the tonic inhibition of ion secretion regulated by opioid receptor was modulated, mu-opioid receptor agonist DAMGO (1 μM) was serosally added. DAMGO showed more inhibition in the colonic basal I_{sc} of control rats ($8.55 \pm 2.02 \mu Amp/cm^2$) than that of stressed rats ($1.94 \pm 0.66 \mu Amp/cm^2$) ($n=5$ tissues, $N= 5$ rats, $p < 0.01$) (Fig. 3).

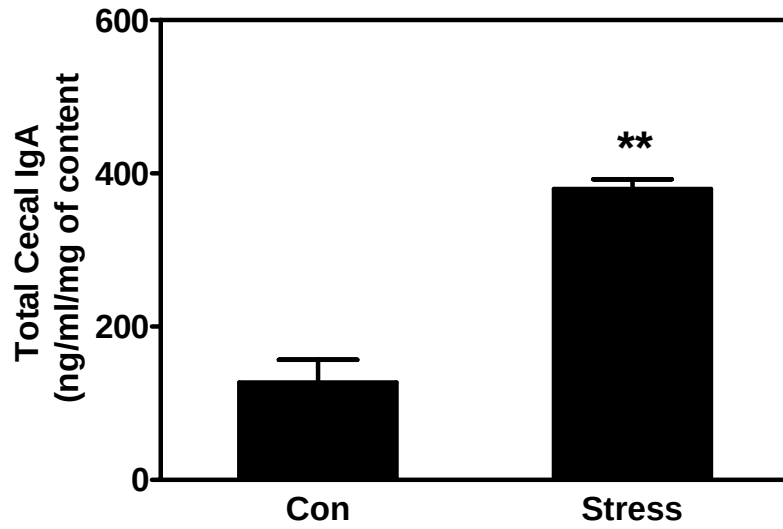


Figure 1 Effects of chronic restraint stress on total caecal immunoglobulin A concentration of control rats (Con) and chronic restraint rats (CRS). Values represent mean $\pm$ SEM of 15 rats per group. ** $P < 0.01$ when compared to the corresponding control value using student t-test.

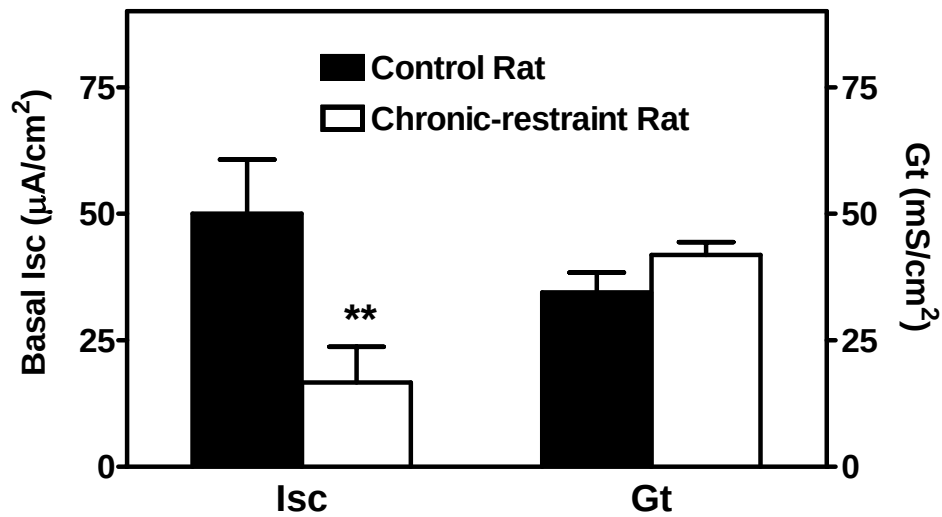


Figure 2 Effects of chronic restraint stress on basal short circuit current (I_{sc}) and tissue resistance (R_t). Values represent mean $\pm$ SEM of 15 rats per group. ** $P < 0.01$ when compared to the corresponding control value using student t-test.

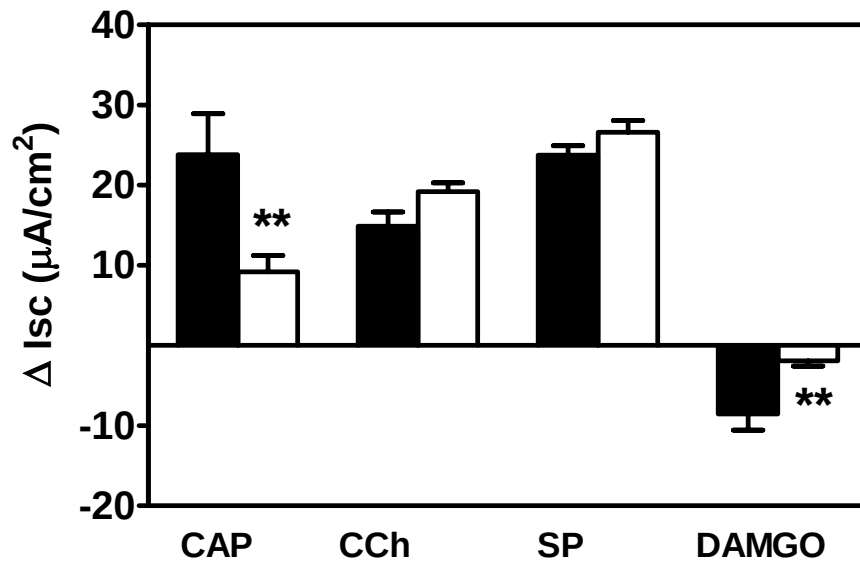


Figure 3 Effects of chronic restraint stress on changes of I_{sc} in response to serosal treatments with vanilloid capsaicin (CAP; 3 μ M), carbachol (CCh; 1 μ M), substance P (SP; 1 μ M) or DAMGO (1 μ M) in colonic segments of control (black bar) vs. restraint-stress rat (white bar). Values represented mean $\pm$ S.E.M. ** $P < 0.01$ when compared to the corresponding control values.

Discussion

In the present study, we have shown that rat colonic mucosa adapted to decrease the ionic secretion and the tissue resistance in response to stress. The homeostatic responses (i.e., increased in % adrenal gland weight ratio, total caecal IgA secretion as well as neutrophilia and lymphopenia) were observed in chronic restraint stress rats. This evidence suggested an activation of neuroendocrine system via the hypothalamic-pituitary-adrenal gland axis in modulating the intestinal secretorymotor function. In addition, the increase in the total caecal IgA could be results of activation of IgA production by plasma cells and stimulation of secretory function in mucosa (Soderholm et al., 2001). The activation of secretory function modulated by chronic stress may be due to a direct stimulation on the secretorymotor neurons or on the epithelium by inflammatory mediators. The indirect stimulation via sensory neurons or

decrease in the inhibitory function mediated by inhibitory neurotransmitters opioids may be possibly affected by stress (Santos and Perdue, 2000). The present study also showed that chronic stress inhibited the vanilloid capsaicin-induced and DAMGO-suppressed changes in *I_{sc}*, suggesting the possibility of the later consideration. However, stress induced changes in immune function in intraepithelial and lamina propria leading to the adaptation of sensory neurons need to be addressed in the further study.

References

1. Collins, S. M. (2001) Stress and the gastrointestinal tract IV Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver. Physiology* 280:G315-318.
2. Cooke, H. J. (2000) Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 915:77-80.
3. degli Uberti E. C., Petraglia, F., Bondanelli, M., Guo, A. L., Valentini, A., Salvadori, S., Criscuolo, M., Nappi, R. E. and Genazzani, A. R. (1995) Involvement of mu-opioid receptors in the modulation of pituitary-adrenal axis in normal and stressed rats. *Journal of Endocrinology Investigation* 18(1):1-7.
4. Santos, J. and Perdue, M. H. (2000) Stress and neuroimmune regulation of gut mucosal function. *Gut. (Suppl IV)*47:49-51.
5. Soderholm, J. D. and Perdue, M. H. (2001) Stress and gastrointestinal tract. II Stress and intestinal barrier function. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver. Physiology* 281:G124-128.
6. Wigger, A., Lorsch, P., Oehler, I., Keck, M. E., Naruo, T. and Neumann, I. D. (1999) Nonresponsiveness of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis to parturition-related events: inhibitory action of endogenous opioids. *Endocrinology* 140(6):2843-2849.
7. Velin, A. K., Ericson, A. C., Braaf, Y., Wallon, C. and Soderholm, J. D. (2004) Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut* 53(4):494-500.
8. Wood, J. D. (2004) Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology* 127:635-657.

Output และกิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

1. การเสนอผลงานในการประชุม Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology และตีพิมพ์บทความ Poonyachoti, S. Deachapunya, C and Kalandakanond-Thongsong, S. (2006) Chronic restraint stress modulates effects of mu-opioid agonists and vanilloid capsaicin on the ion transport in rat colon. In Proceedings of the 5th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. Bangkok, Thailand: 335-339.
2. การเสนอผลงานการประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่ และพบกับเมธีวิจัยอาวุโส สกว เรื่อง “Chronic restraint stress impairs ion secretion mediated by sensory neurons in rat colon” ระหว่างวันที่ 13-15 ตุลาคม 2548 ณ โรงแรมริเจนท์ ซะอ่า จังหวัด เพชรบุรี
3. การเสนอผลงานในการประชุมกลุ่มวิจัย ประจำปีครั้งที่ 1 “เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร. นทีทิพย์ ฤกษ์นามระ ” เครือข่ายวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก เรื่อง “Significances of sensory neurons on regulation of ion transport in intestine and links to bone remodeling” วันที่ 20 ตุลาคม 2548 ณ ห้องประชุม K 102 ตึกอาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. การเสนอผลงานการประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่ และพบกับเมธีวิจัยอาวุโส สกว เรื่อง “Synergistic effect of opioid receptor agonist on the substance P-induced the secretory response” ระหว่างวันที่ 12-14 ตุลาคม 2549 ณ โรงแรมริเจนท์ ซะอ่า จังหวัด เพชรบุรี
5. การเสนอผลงานในการประชุมระดับนานาชาติ BK21 International work shop: Basic Science Application and Technology เรื่อง “The effect of chronic restraint stress on the modulation of nervous system that regulates gastrointestinal function and feeding behavior” วันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2550 ณ College of Veterinary Medicine, Seoul National University กรุงโซล ประเทศเกาหลี
6. การเสนอผลงานการประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่ และพบกับเมธีวิจัยอาวุโส สกว เรื่อง “Acute, sub-chronic and chronic stress exposure differently influences sensory neuron properties and intestinal barrier system” ระหว่างวันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมริเจนท์ ซะอ่า จังหวัด เพชรบุรี
7. การเสนอผลงานในการประชุม Experimental Biology 2007 และตีพิมพ์บทความ Poonyachoti, S. and Deachapunya, C. (2007) Evidences of submucosal neuronal plasticity in distal colon of chronic restraint stress rat. FASEB J. 21: 929.7.