บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

Sample เครื่องมือ สารเคมี และแก๊ส

1. Sample

สายสะดือของทารกที่ได้จากสตรีตั้งครรภ์ครบกำหนด และมีสุขภาพดี จากห้องคลอดโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2. เครื่องมือ

2.1 Organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่ใช้หล่อเลี้ยงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) มีความจุ 20 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกมาทดลองและมีช่องเปิดให้แก๊ส carbogen (CO_2 5% + O_2 95%) ผ่านเข้าไปได้ ชั้นนอกของ organ bath มีน้ำไหลเวียนซึ่งส่งมาจาก water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37± 0.5 องศาเซลเซียส โดยผ่าน thermoregulating water pump เป็นตัวส่งน้ำมาบริเวณดังกล่าว ให้มีอุณหภูมิคงที่ตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4

2.2 Water bath ชนิด thermo bath model SCBI พร้อมด้วย thermoregulating water pump model 2E-Ny ของบริษัท Little Giant Pump

2.3 เครื่องมือวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ isometric transducer

2.4 เครื่องบันทึกผลการทดลอง Universal Oscillograph ของบริษัท Harvard

2.5 เครื่องบันทึกผลการทดลองพร้อมขยายสัญญาณไฟฟ้า Gilson N_2 ของบริษัท Harvard

2.6 เครื่องมือผ่าตัด micro surgery instruments

2.7 เครื่องชั่งละเอียด Mettler AJ 180

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือด

- 5-Hydroxytryptamine creatinine sulfate complex (Sigma)
- Histamine dihydrochloride (Sigma)
- Barium chloride (May & Baker)
- Calcium chloride (Sigma)
- Potassium chloride (Sigma)

3.2 สารทดลอง

- Pentazocine ชนิดฉีดจากบริษัท โอลิค (ประเทศไทย)
- Promethazine ชนิดฉีดจากบริษัท Winthrop Products USA

4. แก๊ส

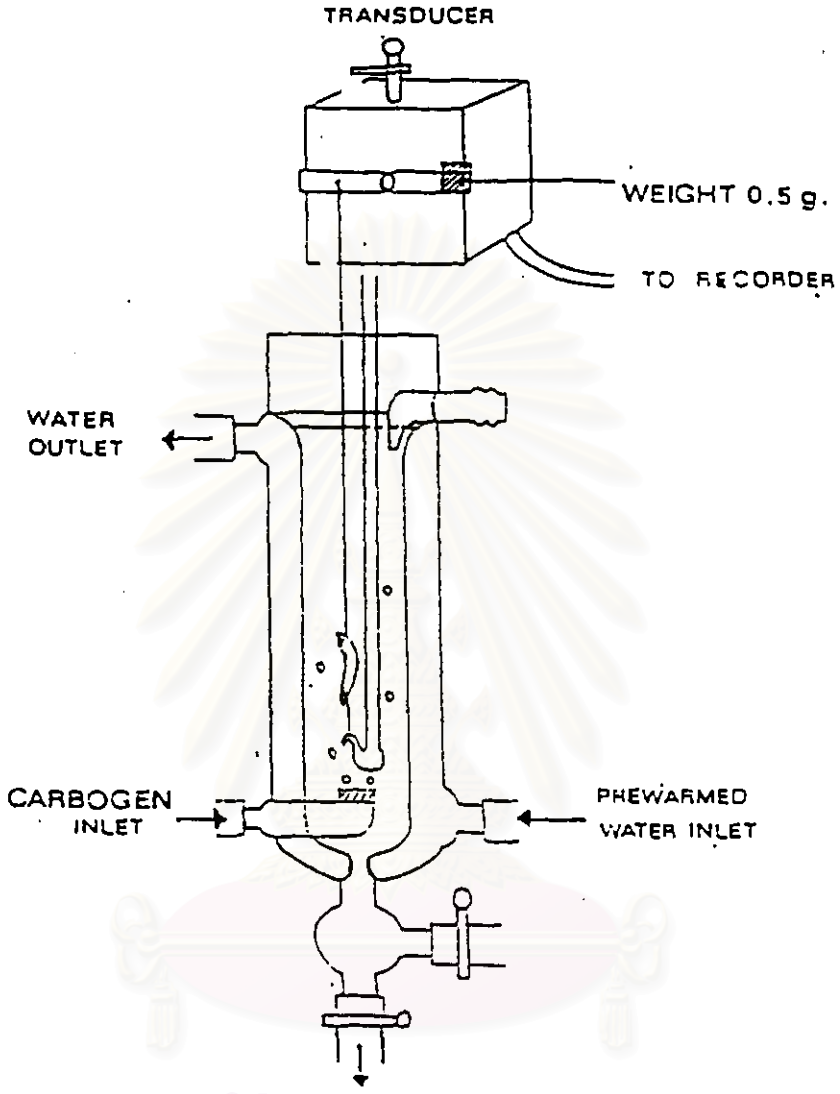
Carbogen gas (95% O_2 +5% CO_2) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas)

วิธีดำเนินการวิจัย

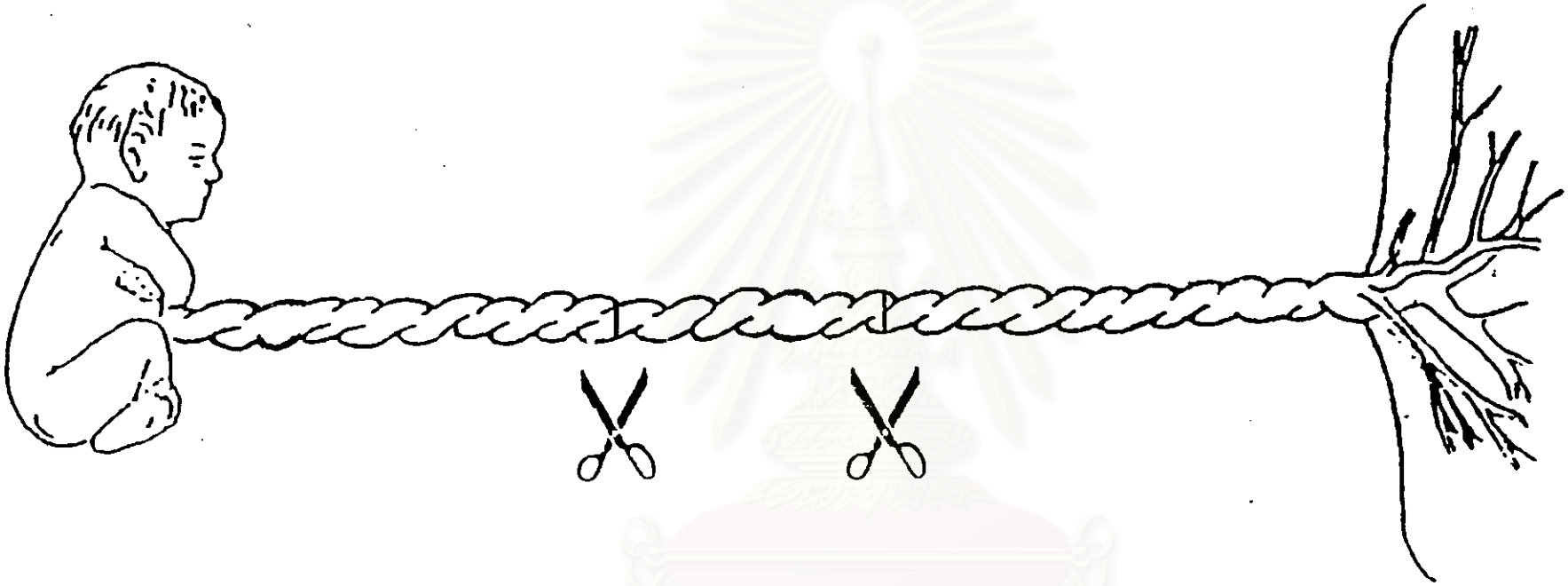
1. การเตรียมหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงที่สายสะดือของมนุษย์

เตรียมสารละลาย Krebs-Henseleit บรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอัด carbogen gas นาน 30 นาที pH 7.35-7.55 เนื่องจากว่าในสภาวะที่เป็นกรดมาก จะมีการลดลงของการเข้า-ออกของ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าไปภายในเซลล์(Betz and Oscornai, 1978; Omote, Takizawa, Nagao, Nasoka and Nakajima, 1981; Harder and Madden, 1986) อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นำมายัง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงการจัดเครื่องมือ Organ bath สำหรับการทดลองกับหลอดเลือดสายสะดือมนุษย์



รูปที่ 5 แสดงตำแหน่งการตัดสายสะดือที่จะนำมาทำการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องคลอด นำสายสะดือของทารกที่ได้จากสตรีตั้งครรภ์ครบกำหนดที่มีสุขภาพดี ปราศจากโรค ดังต่อไปนี้ คือความดันโลหิตสูง เบาหวาน เยื่อบุโพรงมดลูกอักเสบ โรคเลือด โรคไวรัสตับอักเสบบี โรคเอดส์ และในระยะตั้งครรภ์ 2 เดือนก่อนการคลอด ต้องไม่ได้รับยา antihistamine, morphine, adrenergic blocker และ anticholinergic (Tuncer et al., 1985) และทารกที่คลอดออกมาต้องมีค่าของ Apgar score อยู่ในช่วง 8-10 คะแนน จะตัดสายสะดือหลังจากที่รกคลอดทันที โดยจะตัดสายสะดือส่วนกลางระหว่างส่วนของรกกับส่วนของทารก ให้มีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตรดังแสดงในรูปที่ 5 นำมาแช่ใน flask ที่บรรจุ Krebs Henseleit Solution

2. การเตรียมหลอดเลือดเพื่อทดลอง

นำสายสะดือที่เก็บได้ มาตัดให้มีความยาวพอสมควร มาวางใน petri dish ที่บรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit โดยมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา เลาะสายสะดือด้วย micro surgery instruments โดยนำเอา Wharton's jelly ออก จะพบหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก 2 เส้น นำมาตัดแบบ longitudinal strips (Altura et al., 1972) ส่วนหลอดเลือดดำนำมาตัดแบบ ring โดยใช้ด้ายผูกให้ติดกัน แต่ละ ring มีความยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร (ใช้ประมาณ 3 อันมาต่อกัน) (Simon Halevy et al., 1995) ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ด้าน โดยด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ใน organ bath ที่บรรจุ physiological solution 20 มิลลิลตร มี gas carbogen ผ่านตลอดเวลา ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ประมาณ 37 องศาเซลเซียส โดยน้ำที่หล่อจากชั้นนอกของ organ bath ควบคุมการไหลโดย thermoregulating water pump จาก water bath ตลอดเวลา ส่วนปลายเชือกอีกด้านหนึ่ง ต่อกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล และเครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้า ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 โดยดึงหลอดเลือดให้มีความตึงตัวคงที่ประมาณ 1 กรัม โดยใช้เวลา incubate หลอดเลือดประมาณ 120-180 นาที และเปลี่ยน physiological solution ทุก ๆ 15 นาที จนกระทั่งคงที่

3. การทำการวิจัย

3.1 ศึกษาผลของสารกระตุ้นมาตรฐานคือ 5-HT และ histamine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดสายสะดือมนุษย์

3.1.1 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงให้มีความตึงตัวคงที่แล้ว ใส่สารกระตุ้นมาตรฐาน 5-HT ขนาด 10^{-6} M จนหดตัวได้สูงสุด บันทึกผล

3.1.2 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงให้มีความตึงตัวคงที่แล้ว ใส่สารกระตุ้นมาตรฐาน histamine ขนาด 10^{-5} M จนหดตัวได้สูงสุด บันทึกผล

3.2 ศึกษาผลของยา pentazocine และ promethazine ต่อการหดตัวและคลายตัวของหลอดเลือดลายสะดือ เมื่อได้รับสารกระตุ้นมาตรฐาน 5-HT และ histamine

3.2.1 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงในสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งมีความตึงตัวคงที่แล้ว ให้ 5-HT ขนาด 10^{-6} M จนกระทั่งหลอดเลือดหดตัวสูงสุด บันทึกผล หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit แล้ว incubate ต่อประมาณ 30 นาที จนมีความตึงตัวเท่าเดิม ในระหว่างนี้ให้ล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit solution ตลอด หลังจากนั้น ให้ใส่ยา pentazocine 10^{-5} M หลังจากนั้น 5 นาที จึงให้ 5-HT 10^{-6} M บันทึกผล เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง การหดตัวของ 5- HT สูงสุด เมื่อมีและไม่มี pentazocine

3.2.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 โดยเปลี่ยนสารมาตรฐานที่ใช้กระตุ้นเป็น histamine 10^{-5} M บันทึกผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างเมื่อมีและไม่มี pentazocine

3.2.3 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงในสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งมีความตึงตัวคงที่ ให้ 5-HT ขนาด 10^{-6} M จนกระทั่งหลอดเลือดหดตัวสูงสุด บันทึกผล หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution แล้ว incubate ต่อประมาณ 30 นาที จนมีความตึงตัวเท่าเดิม ในระหว่างนี้ให้ล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit solution ตลอด หลังจากนั้นให้ใส่ยา promethazine ในขนาด 10^{-5} M หลังจากนั้น 5 นาที จึงใส่ 5-HT 10^{-6} M บันทึกผล เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง การหดตัวของ 5-HT สูงสุด เมื่อมีและไม่มี promethazine

3.2.4 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 โดย เปลี่ยนสารมาตรฐาน ที่ใช้กระตุ้นเป็น histamine 10^{-5} M บันทึกผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่าง เมื่อมีและไม่มี promethazine

3.2.5 ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 โดยเปลี่ยนสารทดลองที่ใช้เป็น promethazine 10^{-5} M + pentazocine 10^{-5} M ให้ก่อน 5 นาที จึงใส่สารกระตุ้นมาตรฐาน 5-HT 10^{-6} M ศึกษาผลเปรียบเทียบระหว่าง เมื่อมีกับไม่มีสาร promethazine 10^{-5} M + pentazocine 10^{-5} M

3.3 ศึกษากลไกที่เกี่ยวข้อง โดยเปรียบเทียบใน physiological solution ต่าง ๆ กัน เช่น Krebs-Henseleit solution , Ca^{2+}-free KHS, High K^{+}-depolarizing และ Ca^{2+} and HCO_3^- free KHS

3.3.1 ศึกษาผลของ pentazocine เมื่อให้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นต่อหลอดเลือดสายสะดือ ในสารละลาย Krebs-Henseleit solution เปรียบเทียบกับเมื่อใช้ Ca^{2+}-free KHS

เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงในสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งมีความตึงตัวคงที่แล้วให้ pentazocine ขนาด 10^{-5} M ซ้ำไป 6-10 ครั้ง ห่างกันประมาณครั้งละ 1 นาที จนกระทั่งการหดตัวได้สูงสุด บันทึกผล หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit แล้ว incubate ต่อประมาณ 30 นาที จนมีความตึงตัวเท่าเดิม ในระหว่างนี้ล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit solution ตลอด หลังจากนั้นใส่ยา promethazine ในขนาด 10^{-5} M 1 ครั้ง ก่อน 5 นาที จึงใส่ pentazocine ขนาด 10^{-5} M ซ้ำไป 6-10 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการหดตัวของ pentazocine สูงสุด เมื่อมีและไม่มี promethazine

เปลี่ยนแถบหลอดเลือดดำและแดงใหม่ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงด้วย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit จนมีความตึงตัวคงที่แล้ว เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย potassium depolarizing และ incubate ต่อจนมีความตึงตัวคงที่ จึงให้ยา pentazocine ขนาด 10^{-5} M ซ้ำไป 10 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันครั้งละ 1 นาที หลังจากนั้น 5 นาที ให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด 10^{-6}-10^{-3} M ตามลำดับ บันทึกผล

3.3.2 ศึกษาผลของ promethazine ในการต้านการหดตัวของหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงสายสะดือ เมื่อกระตุ้นด้วย calcium chloride ($CaCl_2$) ในสารละลาย potassium depolarizing

เมื่อ incubate แถบหลอดเลือดดำ และหลอดเลือดแดงสายสะดือในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit จนมีความตึงตัวคงที่แล้ว เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลาย potassium depolarizing และ incubate ต่อจนมีความตึงตัวคงที่ ให้ $CaCl_2$ แบบสะสม ขนาด 10^{-6} - 10^{-3} M ตามลำดับ จนแถบเส้นเลือดหดตัวสูงสุด บันทึกผล หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit จนมีความตึงตัวคงที่ จึงเปลี่ยนเป็นสารละลาย potassium depolarizing incubate จนกระทั่งมีความตึงคงที่ จึงศึกษาผลของ promethazine โดยให้ promethazine 10^{-5} M ก่อน 5 นาที หลังจากนั้นให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด 10^{-6} - 10^{-3} M ตามลำดับ บันทึกผล เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose-response curve ของ $CaCl_2$ เมื่อไม่มี promethazine และมี promethazine 10^{-5} M

3.3.3 ศึกษาผลของ pentazocine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงของสายสะดือมนุษย์ เมื่อได้รับการชักนำให้หดตัวด้วย potassium chloride ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit

Incubate แถบหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดง ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit จนแถบหลอดเลือดมีความตึงขณะพักคงที่ จึงให้ KCl 100 mM จนแถบหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผล จากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit 4-5 ครั้ง incubate จนมีความตึงตัวคงที่ จึงศึกษาผลของ pentazocine โดยให้ pentazocine ขนาด 10^{-5} M ก่อน 5 นาที หลังจากนั้นให้สารละลาย KCl 100 mM จนแถบหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเปรียบเทียบผลการหดตัวของหลอดเลือดจาก KCl เมื่อมีและไม่มี pentazocine อยู่ด้วย

3.3.4 ศึกษาผลของ promethazine ต่อการต้านการหดตัวของหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงของสายสะดือมนุษย์ เมื่อได้รับการชักนำให้หดตัวด้วย potassium chloride ในสารละลาย Ca^{2+} -free Krebs-Henseleit

ทำเช่นเดียวกับ ข้อ 3.3.3 โดยเปลี่ยนสารทดลองที่ใช้เป็น promethazine 10^{-5} M ก่อน 5 นาที จึงให้สารละลาย KCl 100 mM จนหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเปรียบเทียบการหดตัวของหลอดเลือดจาก KCl เมื่อมีและไม่มี pentazocine อยู่ด้วย

3.3.5 ศึกษาผลของ pentazocine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงของสายสะดือมนุษย์ เมื่อได้รับการชักนำให้หดตัวด้วย potassium chloride ในสารละลาย Krebs-Henseleit

Incubate แถบหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงในสารละลาย Krebs-Henseleit จนแถบหลอดเลือดมีความตึงตัวขณะพักคงที่ จึงให้ KCl 100 mM จนแถบหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลการหดตัวของหลอดเลือด จากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit จนความตึงตัวกลับมาเท่าเดิม จึงให้สาร pentazocine 10^{-5} M ก่อน 5 นาที จึงให้ KCl 100 mM จนหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเปรียบเทียบการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อมีและไม่มี pentazocine อยู่ด้วย

3.3.6 ศึกษาผลของ promethazine ต่อการต้านการหดตัวของหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงของสายสะดือมนุษย์ เมื่อได้รับการชักนำให้หดตัวด้วย potassium chloride ในสารละลาย Krebs-Henseleit

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.5 โดยเปลี่ยนสารทดลองที่ใช้เป็น promethazine 10^{-5} M ก่อน 5 นาที จึงให้สารละลาย KCl 100 mM จนหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลเปรียบเทียบการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อมีและไม่มี promethazine อยู่ด้วย

3.3.7 ศึกษาผลของ promethazine ต่อการต้านการหดตัวของหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงสายสะดือ เมื่อกระตุ้นด้วย barium chloride ในสารละลาย Ca^{2+}, HCO_3^- -free Krebs-Henseleit

เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงในสารละลาย Krebs-Henseleit จนมีความตึงตัวคงที่แล้ว เปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}, HCO_3^- -free Krebs-Henseleit แล้ว incubate ต่อจนหลอดเลือด มีความตึงตัวคงที่แล้ว จึงให้ $BaCl_2$ แบบสะสมขนาด 1×10^{-4}, 2×10^{-4}, 4×10^{-4}, 6×10^{-4}, 8×10^{-4}, 10×10^{-4} จนถึง 12×10^{-4} M ตามลำดับ จนหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลแล้วจึงล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit solution และ incubate ต่อประมาณ 45 นาที เปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}, HCO_3^- -free Krebs-Henseleit จนมีความตึงตัวเท่าเดิม จึงเริ่มทำการศึกษายา promethazine โดยให้ยา promethazine ขนาด 10^{-5} M ก่อน 5 นาที จึงให้ $BaCl_2$ แบบสะสม ขนาด 1×10^{-4}, 2×10^{-4}, 4×10^{-4}, 6×10^{-4}, 8×10^{-4}, 10×10^{-4} จนถึง 12×10^{-4} M ตามลำดับ บันทึกผลเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง cumulative dose response curve ของ $BaCl_2$ เมื่อไม่มีและมี promethazine

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของ standard physiological solution ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสารละลายที่ใช้ / องค์ประกอบ (mM)	Krebs-Henseleit	Ca^{2+}-free KHS	High K^+ - depolarizing	Ca^{2+} and HCO_3^- - free
Sodium chloride	118.0	118.0	27.0	136.9
Potassium chloride	4.7	4.7	100.0	5.4
Magnesium chloride	-	2.52	0.54	1.0
Magnesium sulfate	1.64	1.64	-	-
Calcium chloride	2.54	-	-	-
Sodium bicarbonate	24.88	24.88	14.00	-
Potassium dibasic phosphate	1.18	1.18	-	-
Glucose	11.10	11.10	11.10	11.10
EGTA	-	0.10	-	0.10
Tris buffer	-	-	-	23.8
Purified water qs	1 Lite	1 Lite	1 Lite	1 Lite