

วิธีดำเนินการค้นคว้าและวิจัย

1. วิธีเตรียมสัตว์ทดลอง

ศึกษาโดยใช้หนูแรทสีขาว พันธุ์ Charles Foster (จาก Dr. H.G. Sen CIBA Research Center, Bombay, India) 307 ตัว น้ำหนักประมาณ 250 - 300 กรัม เลี้ยงในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ 26°C ให้ได้รับแสงสว่างตามธรรมชาติ กินอาหารสำเร็จของบริษัท F.E. Zuellig น้ำดื่มมีให้เพียงพอเพียง หนูที่ทำการทดลองทุกตัวจะทำ vaginal smear ทุกวันในตอนเช้า ระหว่าง 8.00 - 10.00 น. เพื่อควั่นที่มีไข่ตก และจะเลือกหนูที่มีวงการตกไข่เป็นปกติเท่านั้น เมื่อพบว่าหนูอยู่ในระยะ proestrus จะนำตัวผู้มาเพื่อจะให้ผสมในตอนประมาณ 15.00 - 16.00 น. หึงไว้ข้ามคืนเช้าวันรุ่งขึ้นถ้าตรวจพบเชื้ออสุจิในช่องคลอด ถือว่าเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์

2. วิธีเตรียม vein catheter

นำ polyethylene catheter เบอร์ 50 (Clay Adams) ขนาดยาวประมาณ 15 ซม. ตอเข้ากับหลอดฉีดยา ขนาด 1 ลบ.ซม. ซึ่งมีน้ำเกลือที่ผสม heparin อยู่ (0.5% heparin)

3. วิธีเตรียมบอลดูลู

ใช้ small finger cot ผูกเข้ากับปลายหนึ่งของ polyethylene catheter เบอร์ 20 (Clay Adams) ยาวประมาณ 20 ซม. ด้วยไหมดำเบอร์ 5-0 โดยที่ปลายหลอดอีกข้างหนึ่งต่อกับหลอดฉีดยา ขนาด 1 ลบ.ซม. ใส่ น้ำกลั่น - ที่ต้มแล้วเข้าไปในบอลดูลู พยายามอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ในบอลดูลูหรือในหลอด ถ้ามีให้ไล่ออกไปให้หมด เมื่อไม่มีฟองอากาศแล้ว จึงผูกนำออกจากบอลดูลูให้หมด โดยใช้

หลอดลึคนั้น ระวังอย่าให้มีฟองอากาศค้างอยู่ในหลอด จากนั้นนำบอลูนที่ติดกับหลอด และถูกน้ำออกหมดแล้วไปแช่ใน 0.1% zepheron

#### 4. การผ่าตัด

เริ่มทำการผ่าตัดในวันที่ 19 ของการตั้งครรภ์ โดยนำหนูไปชั่งน้ำหนัก จากนั้น ทำให้หนูสลบโดยฉีดยา nembutal (30 ม.ก. คือน้ำหนักตัว 1 ก.ก.) เข้าช่องท้อง เมื่อหนูสลบแล้ว ใช้ปัตตาเรียนตัดขนหนุบริเวณใต้คางกับช่วงไหล่ทางคานขวา บริเวณข้างตัวตรงบริเวณมดลูก ที่หลังคอ จากนั้นนำไปวางบนกระดานที่จะใช้ผ่าตัด นำเครื่องมือผ่าตัดมาแช่ในน้ำซึ่งเติม savlon ลงไป

แบ่งหนูที่ผ่าตัดออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

4.1 พวกที่ใส่เฉพาะ vein catheter เข้าไปในหลอดเลือดดำข้างคอ ทางคานขวา

ผ่าบริเวณใต้คางกับช่วงไหล่ทางคานขวา เมื่อเห็นหลอดเลือดดำข้างคอ แล้วจึงขลิบเส้นเลือดด้วย micro - dissecting scissor แล้วนำ vein catheter ที่ใส่ยาเกล็ดผสม heparin ไว้แล้ว สอดเข้าไปลึกประมาณ 1.5 - 2.0 มม. (รูป 1) ตรวจดูว่า สามารถถูกเลือดออกมาได้คล่องหรือไม่ (รูป 2) ถ้าถูกเลือดได้คล่องก็ผูก catheter เข้ากับเส้นเลือดที่หนาด้วยไหมดำ เบอร์ 5 - 0 จากนั้นฉีกปลายอีก ด้านหนึ่งของ catheter เพื่อปิด แล้วมัด vein catheter เข้าใต้ผิวหนังไปเปิดออกสู่ภายนอกที่หลังคอ เย็บแผลที่ผ่าตัดด้วย เอ็นเบอร์ 4 - 0 เก็บ catheter ไว้ในกล่องพลาสติก โดยติดไว้กับหลังคอกด้วยคลิบสำหรับเย็บแผล

4.2 พวกที่ใส่ทั้ง vein catheter และบอลูน

วิธีใส่ vein catheter ทำเหมือนกับพวกแรก ส่วนวิธีใส่บอลูน เข้าไปในมดลูกทำดังนี้ ผ่าคานข้างลำตัวตรงบริเวณมดลูกอาจจะคานซ้าย หรือขวาก็ได้ แต่ผ่าคานเดียวเท่านั้น เมื่อเห็นมดลูกแล้วค่อย ๆ ดึงปลายมดลูกทางคานที่ติดกับรังไข่ ออกมา (รูป 3) ผ่ามดลูก เพื่อเอาลูกหนูตัวแรกและรกที่อยู่ที่ยี่ปลายมดลูกคานติดกับ -

รังไข่ขึ้นออกมา 1 ตัว (รูป 4) นำหนูและรกไปซัง (รูป 5) จากนั้นใส่บอลูนที่เตรียมไว้แล้วเข้าไปแทน (รูป 6, 7) จากนั้นปิดแผลที่มดลูก แล้วฉีกเข้าไปไว้ในช่องท้องตามเดิม แล้วจึงใส่ปากลันที่ตมแล้วเข้าไปในบอลูน ให้มีปริมาตรเท่ากับน้ำหนักของลูกหนูและรก (1 กรัม เท่ากับ 1 ลบ.ซม.) (รูป 8) จากนั้นใช้ไฟลนปลาย catheter ของบอลูนเพื่อปิด แล้วฉีก catheter นี้ เข้าใต้ผิวหนัง ไปเปิดออกสู่ภายนอกที่หลังคอเช่นกัน เย็บแผลปิดด้วยเอ็น เบอร์ 4 - 0 เก็บทั้ง vein catheter และ catheter ของบอลูน เอาไว้ในกล่องพลาสติก โดยติดกับหลังคอด้วยคลิปสำหรับเย็บแผล (รูป 9)

### 5. การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

- กลุ่มที่ 1    ปล่อยให้หนูคลอดปกติ ใช้หนูทั้งสิ้น 24 ตัว
- กลุ่มที่ 2-8    ใ้รับน้ำนมมะกอก 0.1 ม.ล. ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง วันละ 2 ครั้ง เข้าเย็น โดยเริ่มฉีดตั้งแต่วันที่ 20 - 23 ของการตั้งครรภ์ แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ดังนี้

กลุ่มที่	i.v. infusion	จำนวนหนูที่ infuse อย่างเดียว	จำนวนหนูที่ infuse และวิธีการบีบตัวของมดลูก
2	No infusion	11	10
3	Saline D 21-23	12	8
4	Oxytocin (OT) D 21-23	13	9
5	PGF <sub>2α</sub> D 21-23	9	3
6	PGF <sub>2α</sub> D 21, OT D 22-23	6	3
7	PGF <sub>2α</sub> D 21, Saline D 22-23	7	3
8	Saline D 22-23	9	3

i.v. = intravenous

D = day of pregnancy

PGF<sub>2α</sub> = prostaglandin F<sub>2α</sub>

OT = oxytocin

กลุ่มที่ 9-17 ใ้รับยาอินโคเมทาซินซึ่งละลายในน้ำมันมะกอก ( 1 ม.ก. ต่อ น้ำหนักตัว 1 ก.ก.) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง วันละ 2 ครั้ง เข้าเส้น โดยเริ่มฉีดตั้งแต่วันที่ 20 - 23 ของ การตั้งครรภ์ แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ดังนี้

กลุ่มที่	i.v. infusion	จำนวนหนูที่ infuse อย่างเดียว	จำนวนหนูที่ infuse และวิธีการบีบตัวของมดลูก
9	No infusion	19	8
10	Saline D 21-23	14	4
11	Oxytocin (OT) D 21-23	14	6
12	PGF <sub>2α</sub> D 21-23	11	7
13	PGF <sub>2α</sub> D 21, OT D 22-23	11	8
14	PGF <sub>2α</sub> D 21, Saline D 22-23	11	7
15	Saline D 22 - 23	10	6
16	PGF <sub>2α</sub> & Saline D 22-23	14	6
17	PGF <sub>2α</sub> & OT D 22-23	14	7

i.v. = intravenous

PGF<sub>2α</sub> = prostaglandin F<sub>2α</sub>

D = day of pregnancy

OT = oxytocin

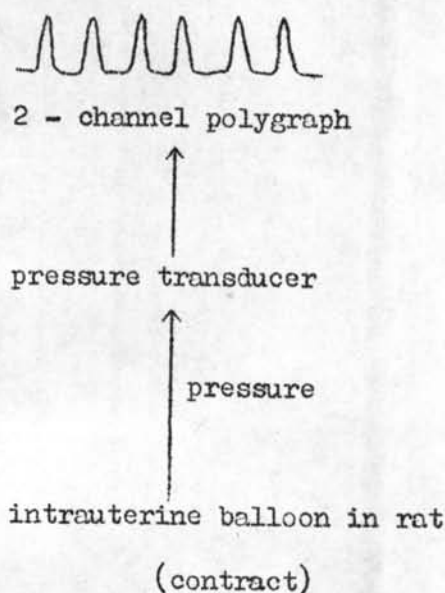
#### 6. การ infuse สารต่าง ๆ เข้าหลอดเลือดดำข้างคอข้างขวา

การ infuse น้ำเกลือ หรือ โปรสแตกแลนดิน เอฟ 2 อัลฟา หรือ ออกซีโทซิน เข้าหลอดเลือดดำ ทำโดยต่อ vein catheter เข้ากับหลอดเลือดขนาด 5 ม.ด. ซึ่งบรรจุสารดังกล่าวไว้ การ infuse ทำโดยใช้ เครื่อง Harvard infusion pump ( model 2681 ) โดยเริ่ม infuse ตั้งแต่ 12.00 - 16.00 น.

ของวันที่ 21 - 23 ของการตั้งครรภ์ ในแต่ละวัน หนูพวกที่ได้รับน้ำเกลือ จะได้รับ  
 ประมาณ 4 ม.ล. คอตัว และพวกที่ได้รับโปรสแตกกลนดิน เอฟ 2 อัลฟา จะได้รับ  
 วันละ 100 ไมโครกรัมคอตัว โดยให้ด้วยอัตราเร็ว 0.42 ไมโครกรัมต่อนาที เป็นเวลา  
 4 ช.ม. และออกซีโทซิน วันละประมาณ 336 มิลลิยูนิต คอตัว โดยให้ด้วยอัตราเร็ว  
 1 มิลลิยูนิต ต่อนาที เป็นเวลา 2 ช.ม. และ 2 มิลลิยูนิต ต่อนาที เป็นเวลา 2  
 ช.ม. แต่ในกลุ่มที่ 8, 15-17 นั้น เริ่ม infuse ตั้งแต่ 12.00 - 16.30 น. ของ  
 วันที่ 22, 23 ของการตั้งครรภ์ โดยแต่ละวันหนูจะได้รับน้ำเกลือประมาณ 5 ม.ล. คอ  
 ตัว โปรสแตกกลนดิน เอฟ 2 อัลฟา 100 ไมโครกรัม คอตัว และ โปรสแตกกลนดิน  
 เอฟ 2 อัลฟา 100 ไมโครกรัม ผสมกับออกซีโทซิน 80 มิลลิยูนิต คอตัว

#### 7. การบันทึกการบีบตัวของมดลูก

ทำการบันทึกการบีบตัวของมดลูกในระหว่างเวลา 11.00 - 16.30 น. ของ  
 วันที่ 21 - 23 ของการตั้งครรภ์ หรือในเวลา 11.00 - 17.00 น. ของวันที่ 22-  
 23 ของการตั้งครรภ์ ทำโดยสอด catheter ของบอลูน เข้ากับ catheter  
 ที่สอดเข้ากับ statham pressure transducer ( model P 23 AC ) แล้วต่อเข้า  
 2 - channel polygraph ( Grass model 79 C ) อีกทีหนึ่ง ดังแผนภาพ



เมื่อเริ่มหรือหยุด infuse ให้จดลงไปในกระดาษกราฟที่บันทึกการบีบตัวของมดลูกอยู่ด้วย ว่า infuse อะไร ความเร็วเท่าไร เวลาอะไร ถ้าหยุดคลอดในระหว่างที่ infuse จะบันทึกเวลาที่ลูกหนูแต่ละตัวคลอดออกมาลงในกระดาษกราฟขณะบันทึกการบีบตัวของมดลูกด้วย จนกว่าจะคลอดหมดทุกตัว ลูกหนูที่คลอดตัวที่เท่าไร เป็นหรือตาย ต้องบันทึกลงในกระดาษกราฟทั้งหมด สำหรับหนูที่คลอดในระหว่างที่บันทึกการบีบตัวของมดลูกอยู่นั้น ถ้าคลอดไม่หมดหลังจากที่หยุด infuse แล้ว จะยังคงบันทึกการบีบตัวของมดลูกต่อไปอีก จนกว่าจะคลอดลูกออกมาหมดทุกตัว จึงหยุดการบันทึก

หนูทุกกลุ่ม ( 1 - 17 ) ไม่ว่าจะใส่บอลูน หรือไม่ใส่ก็ตาม จะบันทึก

- 1) ระยะเวลาการตั้งครรภ์ (วัน) โดยถือว่าวันที่พบเชื้ออสุจิของคลอด เป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ จนกระทั่งเวลาที่คลอดลูกตัวที่ 1 (หลัง 24.00 น. ถือว่าเป็นวันใหม่)
- 2) ช่วงเวลาในการคลอด (ช.ม.) โดยคิดจากเวลาที่คลอดลูกตัวที่ 1 จนถึงตัวสุดท้าย
- 3) สภาพของลูกหนูที่เกิด เพื่อคว่ามีลูกหนูตายกี่ตัว ลักษณะของลูกหนูที่ตายเป็นอย่างไ
- 4) ในพวกที่ใส่บอลูน จะบันทึกการบีบตัวของมดลูก ก่อน ระหว่าง หลังการ infuse และในขณะคลอดด้วย

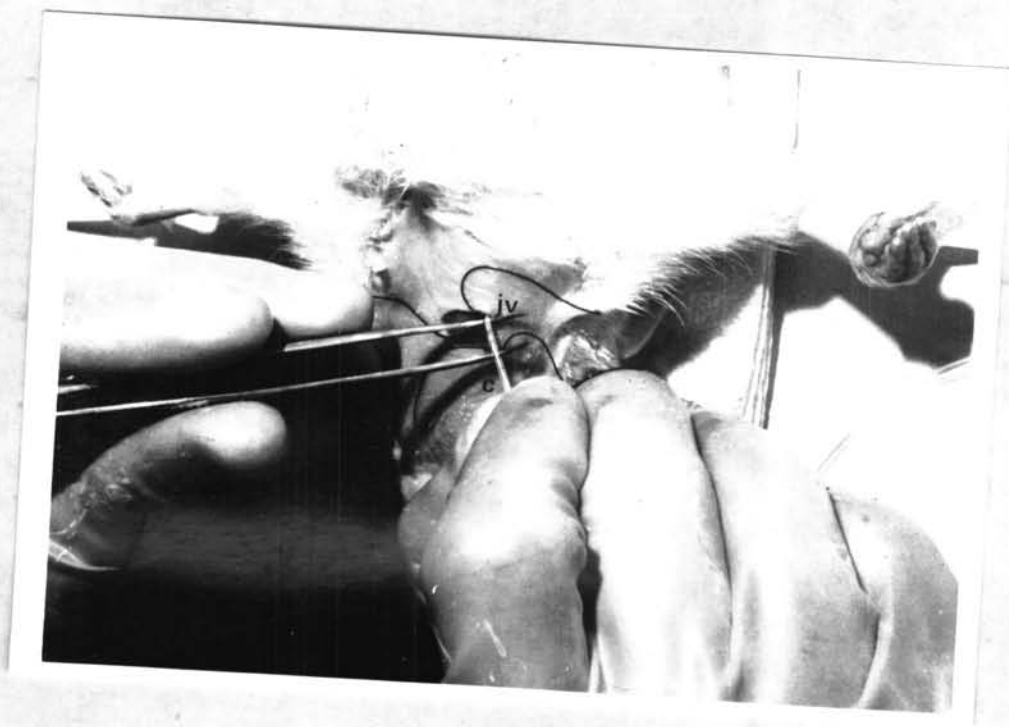
## 8. สารที่ใช้ทดสอบ

- 8.1) ยาอินโคเมทาซิน (ได้รับจากบริษัท Merck Sharp & Dohme)
- 8.2) โปรสแตกแกลนคิน เอฟ 2 อัลฟา free acid (ได้รับจาก Dr. John E. Pike บริษัท Upjohn U.S.A.) นำโปรสแตกแกลนคิน เอฟ 2 อัลฟา free acid 10 ม.ก. ละลายใน 1 ม.ล. absolute alcohol เก็บไว้เป็นสต็อก ทำให้เจือจางโดยใช้น้ำเกลือ (สภากาชาดไทย) ความเข้มข้นของโปรสแตกแกลนคิน เอฟ 2 อัลฟา ที่เตรียม คือ 25 ไมโครกรัม ต่อ ม.ล.

- 8.3) ออกซีโทซิน ( Syntocinon บริษัท Sandoz ) ทำให้เจ็บจาง  
 โดยใช้น้ำเกลือ (สภาพอากาศไทย) ความเข้มข้นที่ใช้คือ 80 มิลลิยูนิต  
 ต่อ ม.ล.
- 8.4) น้ำเกลือ 0.9% (กองวิทยาศาสตร์ สภาพอากาศไทย)

### 9. การหาค่าทางสถิติ

การเปรียบเทียบค่าทางสถิติ เกี่ยวกับระยะเวลาการตั้งครรภ์ และช่วงเวลา  
 ในการคลอดในระหว่างกลุ่ม ใช้วิธี unpaired T test ส่วนการเปรียบเทียบ -  
 ความแรงและความถี่ของการบีบตัวของมดลูกก่อนและหลัง infuse ใช้  
 วิธี paired T test

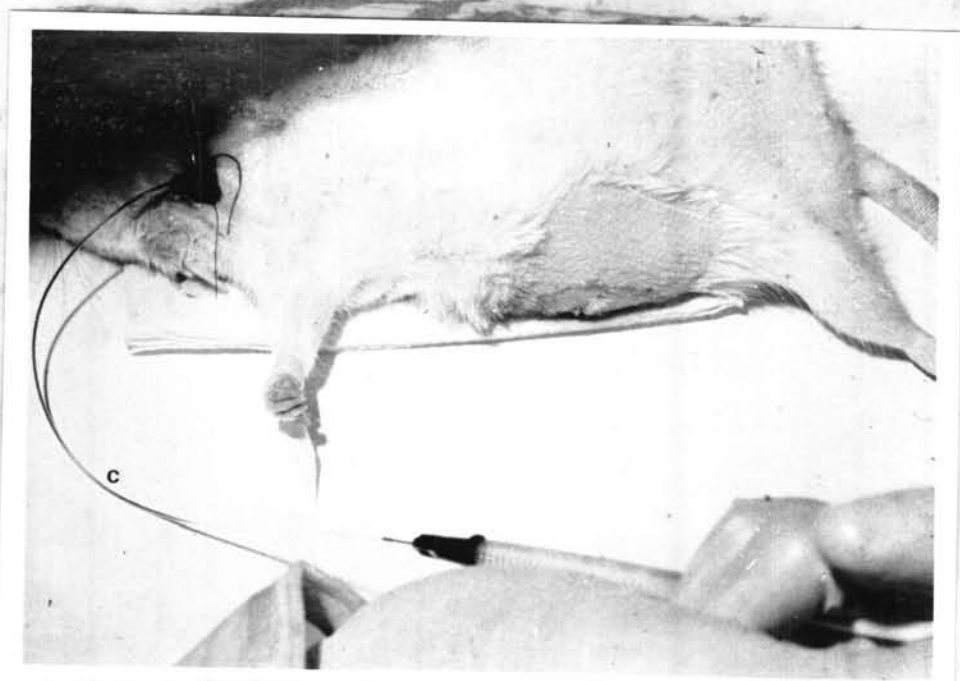


รูปที่ 1 แสดงการสอด polyethylene catheter เข้าใน  
jugular vein ข้างขวา

jv = jugular vein

c = catheter





รูปที่ 2 แสดงการตรวจสอบว่า vein catheter เข้าไปใน vein  
เรียบร้อยแล้ว โดยตongดูดเลือดขึ้นมาใน catheter ๑

c = catheter

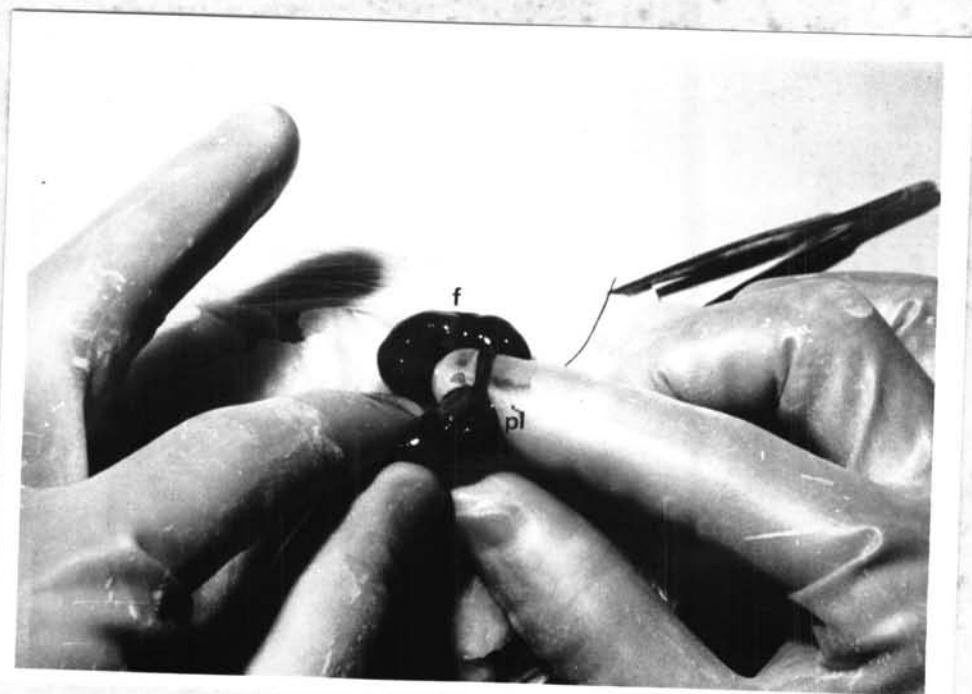


รูปที่ 3 แสดงปลายของมดลูกด้านที่ติดกับรังไข่

ut = uterus

ov = ovary

002439



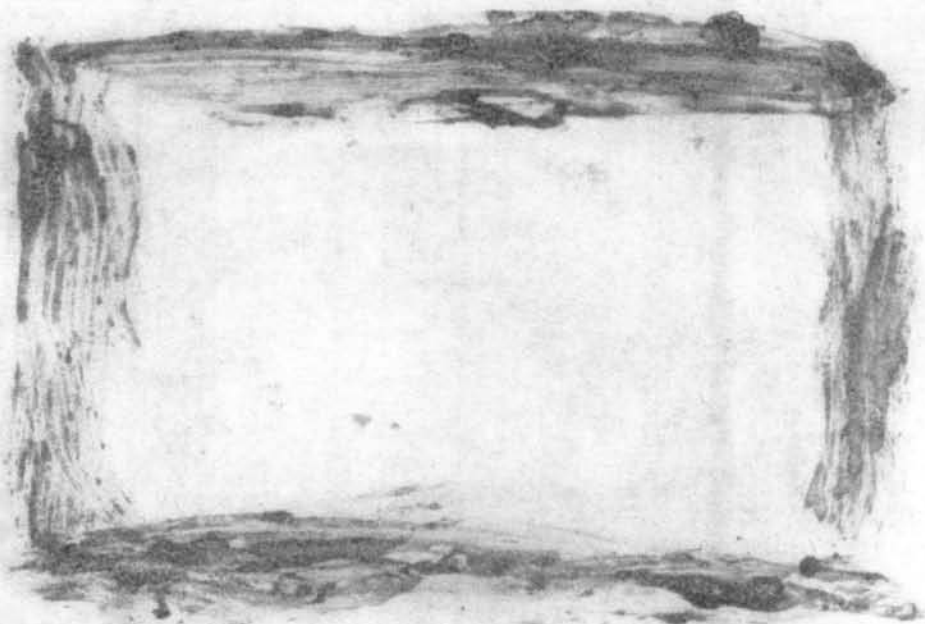
รูปที่ 4 เมื่อผ่ามดลูกคานที่ติดกับรังไข่ออกแล้ว เอาลูกออกมา  
1 ตัว พร้อมกับรก

f = fetus

pl = placenta

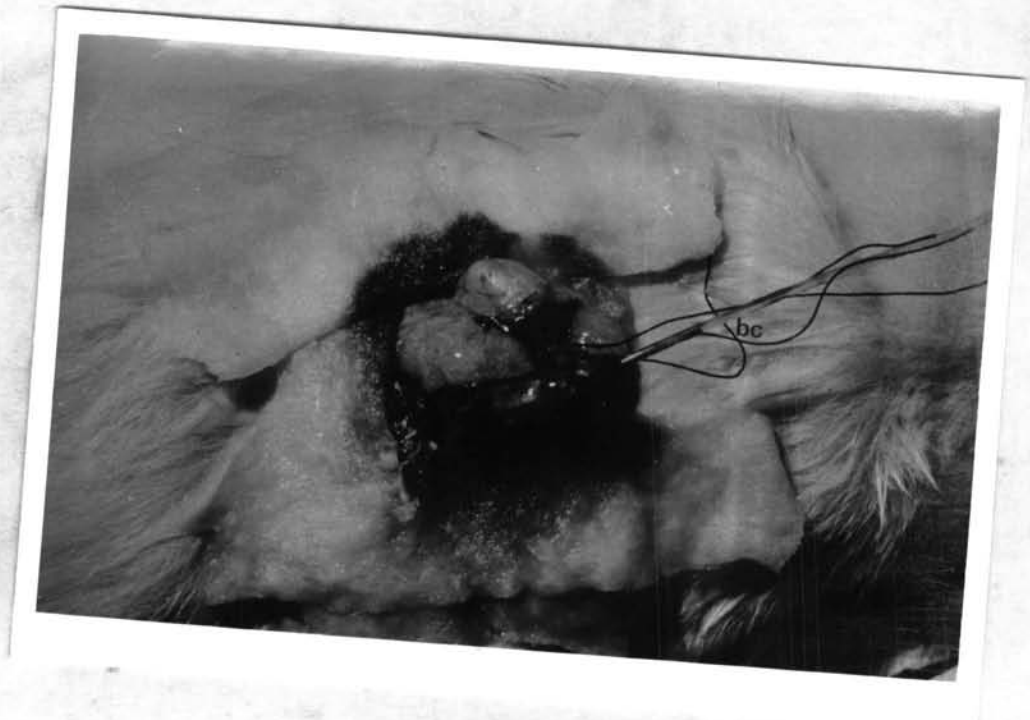


รูปที่ 5 นำสุกหนูและรกมาซึ่งน้ำหนัก (กรัม)



รูปที่ 6 สอดบอลลูนเข้าไปแทนที่ลูกหนูและรถที่เอาออกไปแล้ว

b = balloon



รูปที่ 7 ใส่หลอดลม เข้าไปในมดลูก พร้อมกับเย็บมดลูกปิดแล้ว

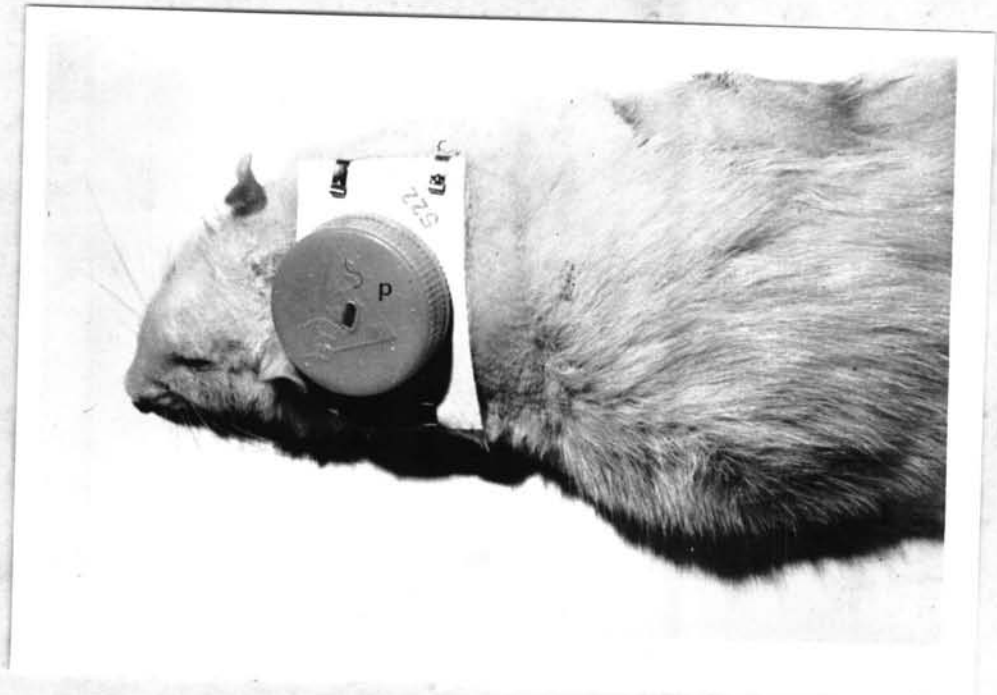
bc = balloon catheter



รูปที่ 8 ใส่น้ำกลั่นเข้าไปในบอลลูน ให้มีปริมาตรเท่ากับน้ำหนัก  
ของลูกหนูและรก ( 1 ด.บ.ช.ม. = 1 กรัม )

bc = balloon catheter

s = syringe filled with  
distilled water



รูปที่ 9 สอดทั้ง vein catheter และ balloon catheter  
 เข้าใต้ผิวหนัง แล้วมาเปิดออกที่หลังคอ แล้วเก็บใส่ -  
 กลองพลาสติก

p = plastic cap