บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 สารสื่อประสาท

Acetylcholine chloride, Atropine (Free Base), (-)Arterenol [(-) Norepinephrine bitartrate] Prazosin hydrochloride, DL-Propranolol hydrochloride, Serotonin creatinine sulfate complex และ 50% Glutaldehyde จากบริษัท Sigma ประเทศอังกฤษ

L-Ascorbic acid จากบริษัท BHD ประเทศอังกฤษ

Dopamine HCl จากบริษัท Hausmann ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

Droperidol ของบริษัท Janssen Pharmaceutical ประเทศเบลเยี่ยม ภายใต้ชื่อการค้า Dehydrobenzperidol ®

Ketanserin ของบริษัท Janssen Pharmaceutical ประเทศเบลเยี่ยม ภายใต้ชื่อการค้า Sufrexal ®

สารเคมีที่จำเป็นในการเตรียม Krebs - Henseliet Solution ได้แก่ NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$, KH_2PO_4, $NaHCO_3$, Glucose และ Sodium Pyrurate จากบริษัท Sigma ประเทศอังกฤษ

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Phosphate buffer ได้แก่ Na_2HPO_4 และ KH_2PO_4 จากบริษัท Sigma ประเทศอังกฤษ

Gas ที่ใช้ในการทดลอง คือ Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) จากบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)

1.2 สัตว์ทดลอง

สุกรไม่จำกัดเพศ น้ำหนักประมาณ 90-100 กิโลกรัม ซึ่งนำมาฆ่าเพื่อจำหน่ายในตลาดสดจากโรงฆ่าสัตว์ กล้วยน้ำไท กรุงเทพฯ

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการวิจัย

เครื่องมือ universal oscillograph และ Isotonic transducer ของบริษัท Harvard ประเทศอังกฤษ

Thermoregulating water pump ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน สำหรับควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ไหลเวียนในชั้นนอกของ Organ bath chamber และอุณหภูมิของสารละลาย Krebs-Henseleit Solution

Organ bath chamber 2 chambers ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในมีความจุของปริมาตร 25 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกออกมาเพื่อทำการทดลอง ชั้นนอกมีการไหลเวียนของน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อควบคุมอุณหภูมิของสารละลายใน Chamber ชั้นใน

เครื่องชั่งละเอียด Sartorius รุ่น A 200 S จากประเทศเยอรมัน

2. <u>วิธีดำเนินการวิจัย</u>

2.1 การเตรียม standard physiological solution (Krebs-Henseleit Solution) ซึ่งสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบตามที่กำหนดในตารางที่ 1 ละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์

สารเคมี	ปริมาณ	
	มิลลิโมล/ลิตร	กรัม/ลิตร
NaCL	118.0	6.9
KCL	4.7	0.35
$CaCl_2$	2.52	0.28
$MgSO_4$	1.64	0.14
KH_2PO_4	1.18	0.16
$NaHCO_3$	24.88	2.09
Glucose	5.55	1.09
Sodium pyrurate	2.0	0.22
Aerating gas 95% O_2 + 5% CO_2		

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของ Krebs - Henseliet Solution

2.2 การเตรียมสารละลาย Phosphate buffer pH 7.4 เพื่อให้การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope ซึ่งสารเคมีตามที่กำหนดไว้ดังนี้

0.1 M NaH_2PO_4 จำนวน 0.71 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มล.

0.1 M KH_2PO_4 จำนวน 0.272 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มล.

นำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน โดยเติมสารละลาย NaH_2PO_4 ลงในสารละลาย KH_2PO_4 ค่อย ๆ ปรับ pH จนกระทั่งได้ค่า pH 7.4 และมีปริมาตรทั้งสิ้นประมาณ 60 มล.

2.3 สารละลายของสารสื่อประสาทและสารละลายยา

ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น final concentration ในสารละลาย Krebs-Henseleit ใน Organ bath ซึ่งคำนวนได้จากสูตรดังนี้

* ในกรณีที่เป็นของแข็งคำนวนจาก $P(g) = \frac{X \times MW \times a \times b}{1{,}000 \times c}$

* ในกรณีที่เป็นสารละลายคำนวนได้จาก $Q(g) = \frac{y\ (มก./มล.) \times C}{MW \times a \times 1{,}000}$

โดยที่ X = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการเตรียม

y = น้ำหนักของสารละลายที่ต้องการใช้ (มก.)

a = ปริมาตรของสารละลายใน (25 มล.)

b = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการเตรียม (5 มล.)

c = ปริมาตรของยาเตรียมที่ฉีดเข้าไปใน (0.1 มล.)

MW = มวลโมเลกุลของสารเคมี

<u>สารสื่อประสาทและสารเคมีที่เตรียมในรูปสารละลายในการทดลองครั้งนี้ประกอบด้วย</u>

1. Acetylcholine

ชั่ง acetylcholine hydrochloride (MW=181.7) จำนวน 0.0225 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 5 มล. จะได้สารละลายของ Acetylcholine ความเข้มข้น 1×10^{-4} M นำมาเจือจางลงเพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-4}-10^{-7} M

2. Atropine

ชั่ง atropine (Free Base) (MW = 289.4) จำนวน 0.0362 g ละลายในน้ำกลั่น 5 มล. จะได้สารละลายของ Atropine ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-6} M

3. Potassium chloride

ชั่ง KCl (MW = 74.55) จำนวน 1.3978 g ละลายในน้ำกลั่น 5 มล. จะได้สารละลายของ Potassium chloride ที่มีความเข้มข้น 15 mM

4. 1% Ascorbic acid

ชั่ง ascorbic acid 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 5 มล. จะได้สารละลาย ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น 1 มก.% ซึ่งสารละลายนี้จะนำไปใช้เป็น antioxidant ในสารละลายของ norepinephrice และ propranolol ต่อไป

5. Norepinephrine

ชั่ง norepinephrine bitartrate (MW = 319.8) จำนวน 0.0399 กรัม ละลายในสารละลาย 1% ascorbic acid 5 มล. จะได้สารละลาย norepinephrine ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-4}M ทำการเจือจางลงด้วยน้ำกลั่น ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น $10^{-4} - 10^{-7}$ M

6. Prazosin

ชั่ง prazosin hydrochloride (MW=419.9) จำนวน 0.0005 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 5 มล. จะได้สารละลายของ prazosin ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-6} M

7. Yohimbine

ชั่ง yohimbine hydrochloride (MW = 390.9) จำนวน 0.0489 กรัม ละลายใน 95% Ethanol 1 มล. ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มล. ได้สารละลายของ yohimbine ที่มีความเข้มข้น 5×10^{-4} M

8. Propranolol

ชั่ง propranolol hydrochloride (MW = 295.8) จำนวน 0.0369 กรัม ละลายในสารละลาย 1% ascorbic acid 5 มล. จะได้สารละลายของ propranolol ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-4} M

9. Serotonin (5-HT)

ชั่ง serotonin creatinine sulfate complex (MW = 387.4) จำนวน 0.0484 g ละลายในน้ำกลั่น 5 มล. จะได้สารละลายของ serotonin ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-4} M ทำการเจือจางลงด้วยน้ำกลั่น ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-4} - 10^{-7} M

10. Ketanserin

ใช้ ketanserin hydrochloride injection (MW = 395.4) หรือ Sufrexal ® (10 มก./2 มล.) ปริมาณ 0.1 ml มีความเข้มข้น 2.53×10^{-2} M ทำการเจือจางลงด้วยน้ำกลั่น ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-3} M

11. Dopamine

ใช้ Dopamin Hausmann Injection (MW=189.6) จากขวดบรรจุที่มีปริมาณยา Dopamine 250 มก./10 มล. เมื่อต้องการเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-3}-10^{-8} M ทำได้โดย

11.1 ดูดยา 0.2 มล. จะมีความเข้มข้น 1×10^{-3} M

11.2 ดูดยา 1 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 5 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1×10^{-4} M

11.3 นำสารละลายจากข้อ 11.2 มา 0.5 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 5 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1×10^{-5} M

11.4 นำสารละลายจากข้อ 11.3 มา 0.5 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 5 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1×10^{-6} M

11.5 นำสารละลายจากข้อ 11.4 มา 0.5 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 5 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1×10^{-7} M

11.6 นำสารละลายจากข้อ 11.5 มา 0.5 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 5 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1×10^{-8} M

12. Droperidol

นำ Droperidol Injection (MW=379.4) หรือ Dehydrobenzperidol ® (5 มก./2 มล.) 2 มล. มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 มล. จะได้สารละลายของ droperidol ที่มีความเข้มข้น 1×10^{-5} M

<u>หมายเหตุ</u> :

1. เนื่องจากยาบางตัวที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ norepinephrine และ propranolol สามารถเกิดปฏิกริยา autoaxidation ทำให้สารละลายตัวได้ง่าย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องละลายสารเหล่านี้ในสารละลาย 1% ascorbic acid เพื่อป้องกันปฏิกริยาดังกล่าว

2. ปริมาตรของสารละลายาที่ใส่ลงใน organ bath มีปริมาตรอยู่ระหว่าง 0.5-1.5 มล. คิดเป็น 2-6% ของปริมาตรใน organ bath

3. เนื่องจาก yohimbine hydrochloride ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงต้องละลายใน 95% Ethanol ก่อนแล้วจึงนำไปทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นของ Ethanol ในการละลายที่ใช้ ได้มีการนำไปทดสอบกับเนื้อเยื่อใน organ bath แล้วผลปรากฏว่า ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของชิ้นเนื้อเยื่อหลอดเลือด

4. สารละลายาทุกตัวจะเตรียมขึ้นใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง จะไม่ใช้สารละลายเก่าที่เก็บไว้นานเกิน 2 วัน

2.4 การเตรียมหลอดเลือดแดงที่หัวใจ (coronary artery) และที่ไต (renal artery) ของสุกร

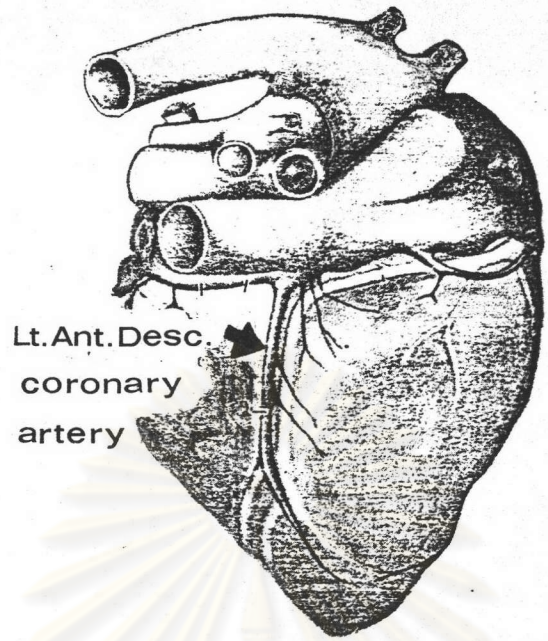
ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมหลอดเลือดแดงจากหัวใจสุกร

แยกเอาหัวใจสุกรออกภายหลังที่สุกรถูกฆ่าตามวิธีการของโรงฆ่าสัตว์ภายใน 20 นาที หลังจากที่สัตว์ตาย เลาะหลอดเลือดแดงเลี้ยงหัวใจ (coronary artery) จากบริเวณ proximal left anterior descending โดยสังเกตจากบริเวณที่เป็นเส้นเลือดที่แยกออกจากหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ตามภาพ 2.1 เลาะหลอดเลือดให้ยาวประมาณ 4-5 ซม. ตัดแล้วเก็บใส่ flask 50 มล. ที่บรรจุ Krebs-Henseleit Solution ผ่านก๊าซ carbogen นาน 5 นาที (pH 7.35-7.45) อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส นำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ

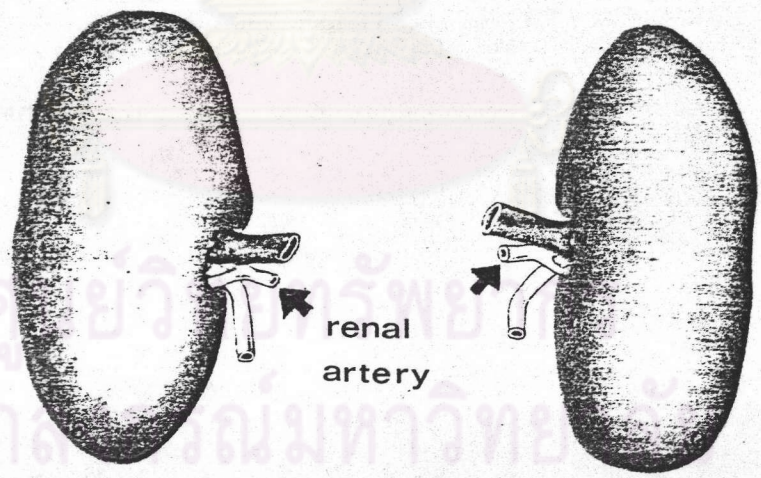
การเตรียมหลอดเลือดแดงจากไตของสุกร

แยกเอาหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงไต (renal artery) จากสุกรที่ได้รับการชำแหละโดยผ่าบริเวณกลางลำตัว ทำให้เห็นไตของสุกรได้ชัดเจน เมื่อเลาะเยื่อบุช่องท้องออกจะเห็น renal artery ที่เป็นแขนงแยกจากหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ตามภาพ 2.1 เลาะหลอดเลือดให้ยาวประมาณ 4-5 ซม. ตัดแล้วเก็บใส่ flask ขนาด 50 มล. ที่บรรจุ Krebs-Henseleit solution ผ่านก๊าซ carbogen นาน 5 นาที pH 7.35-7.45 อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส นำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ

หลอดเลือดที่เก็บมานี้เมื่อยังไม่นำมาทดลองควรเก็บไว้ในตู้เย็น แล้วนำมาใช้ทดลองภายในวันเดียวกัน



หัวใจสุกร



ไตสุกร

ภาพที่ 2.1 แสดงตำแหน่งของหลอดเลือดแดงที่แยกจากหัวใจและไตของสุกร

ขั้นตอนที่ 2

นำหลอดเลือดใส่ใน Petri-dish ซึ่งบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit ผ่านก๊าซ carbogen ตลอดเวลา เลาะเนื้อเยื่อที่ติดมาอีกครั้งแล้วจึงค่อย ๆ ตัดหลอดเลือดเป็นเส้นเกลียว (spiral strip) ขนาดกว้าง 2-3 มิลลิเมตร, ยาว 2-3 เซนติเมตร ผูกปลายด้านล่างเข้ากับที่ยึด แช่ลงใน organ bath chamber ปลายด้านหนึ่งของหลอดเลือดผูกกับคานเคาะสัญญาน (Isotonic Tranducer) บันทึกผลการทดลองด้วยเครื่อง oscillograph ปลายด้านหนึ่งของคานถ่วงน้ำหนัก 0.5 กรัม (ภาพ 2.2)

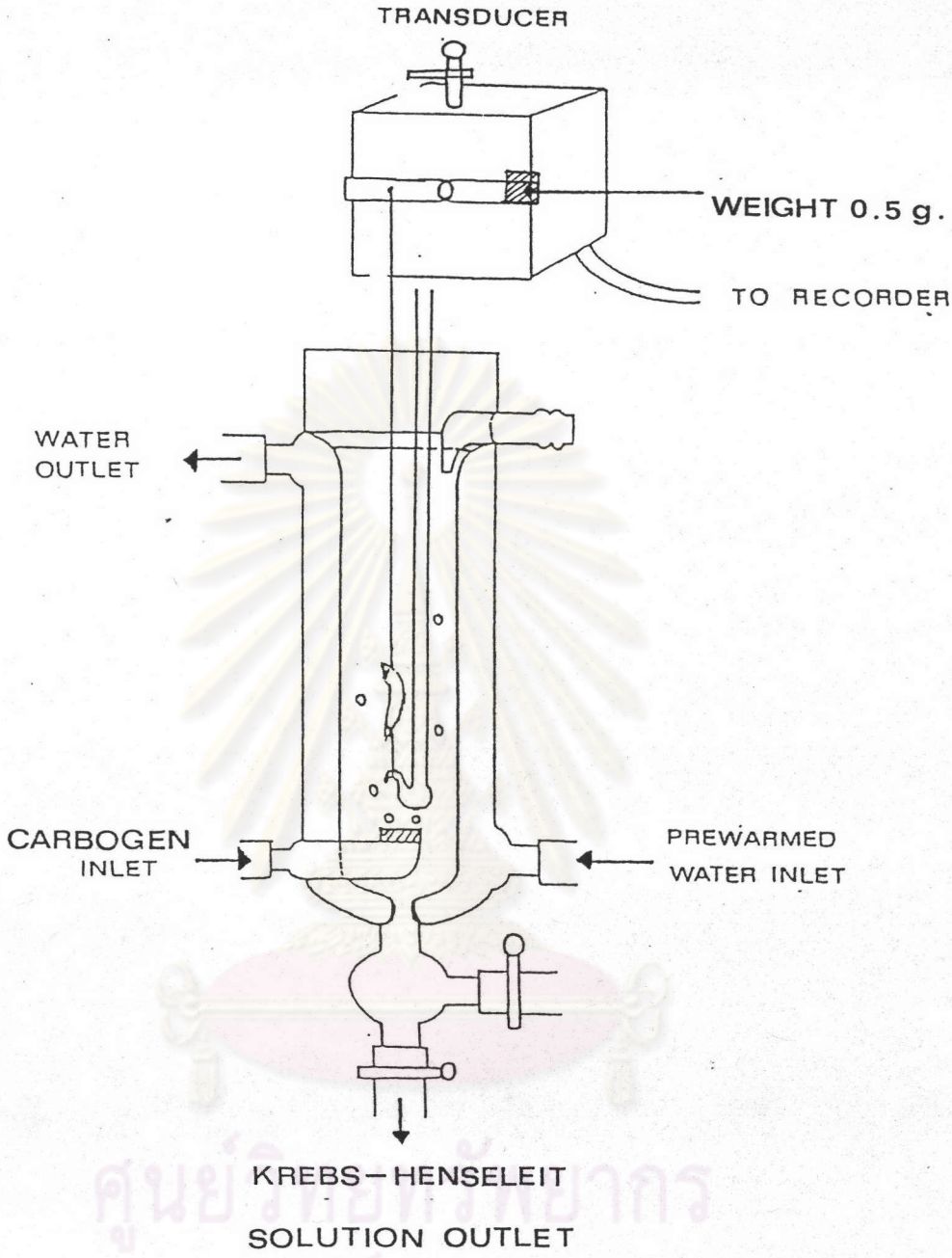
ควบคุมอุณหภูมิของ krebs-Henseleit Solution ภายใน organ bath ให้อยู่ที่ระดับ 37 องศาเซลเซียส pH 7.4 ผ่านก๊าซ carbogen เข้าไปใน organ bath ตลอดเวลา

หลอดเลือดที่เตรียมขึ้นใหม่ทุกครั้ง ควรทำการ Preincubation ไว้อย่างน้อย 90-120 นาที เปลี่ยนถ่าย solution ใหม่ทุก 15-20 นาที เพื่อล้างสิ่งปนเปื้อน และเพื่อให้หลอดเลือดมีการหดรัดตัวอย่างสม่ำเสมอก่อนจึงเริ่มทำการทดลองโดยบันทึกการตอบสนองของหลอดเลือดแดงในสภาวะต่าง ๆ

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมหลอดเลือดที่ปราศจากเยื่อบุหลอดเลือด (De-endothelium)

เพื่อที่จะทดสอบอิทธิพลของเยื่อบุหลอดเลือด จะทำการขูดเยื่อบุผนังในของหลอดเลือดที่เตรียมขึ้นโดยใช้ไม้พันสำลีขูดเบา ๆ ใน petri-dish ที่มี Krebs-Henseleit solution แล้วแช่ลงใน Organ bath chamber ทำการ Pre-incubation อย่างน้อย 90-120 นาที หรือจนกระทั่งหลอดเลือดมีการหดรัดตัวคงที่ จึงเริ่มทำการทดลองโดยบันทึกการตอบสนองของหลอดเลือดแดงในสภาวะต่าง ๆ

การยืนยันผลการทดลองในเรื่องบทบาทของ Endothelium ที่มีต่อการตอบสนองนั้นใช้การทดสอบด้วย ACh 10^{-6} M และใช้วิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope (SEM))



ภาพที่ 2.2 แสดงการจัดเตรียมเครื่องมือสำหรับทดลองกับ porcine artery

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

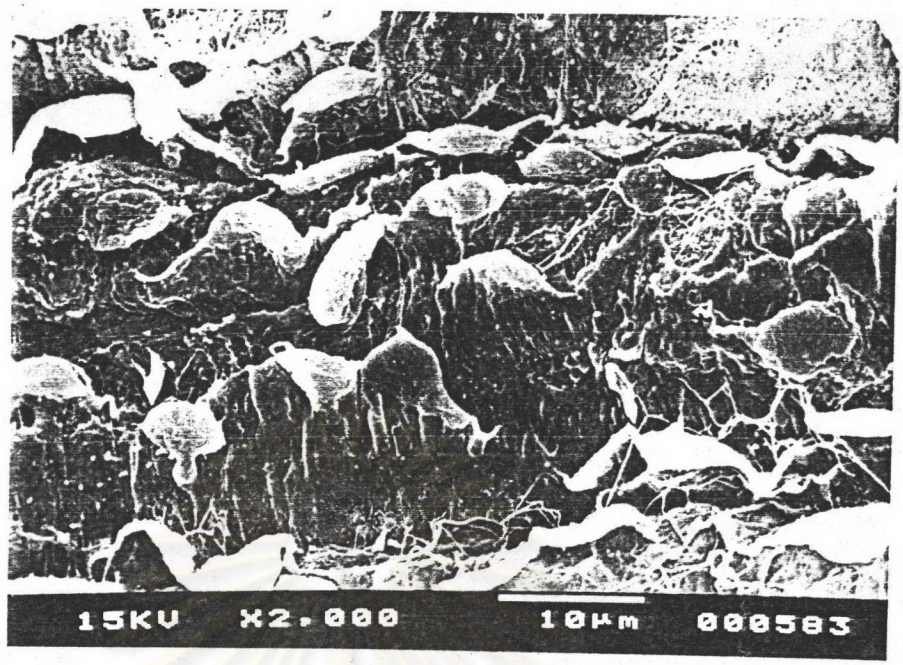
ขั้นตอนที่ 4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (SEM)

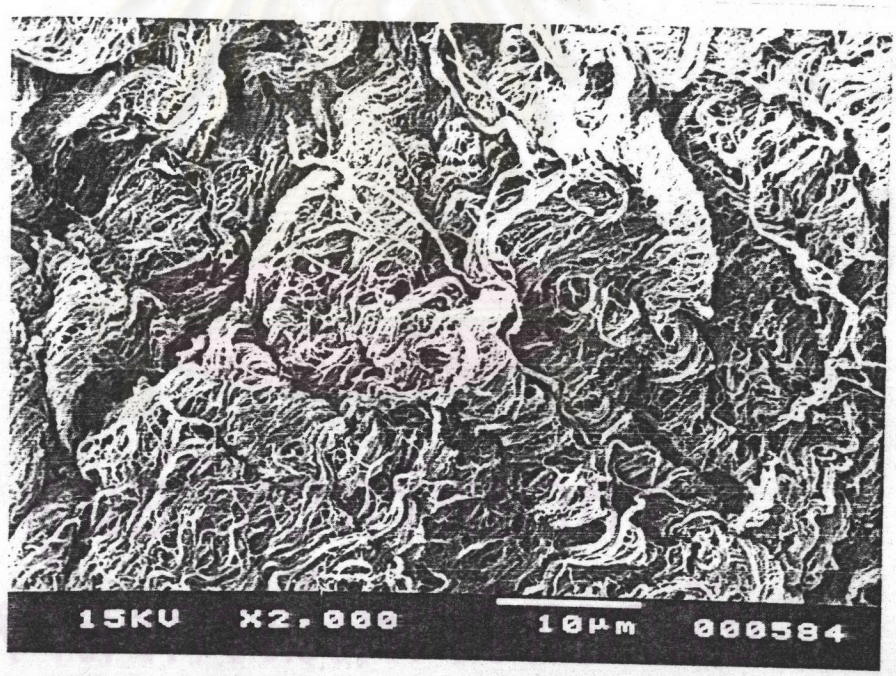
เตรียม 2% glutaldehyde จาก 50% Glutaldehyde โดยใช้ Phosphate buffer pH 7.4 เป็นตัวทำละลาย นำหลอดแดงแดงเลี้ยงหัวใจ (Coronary artery), หลอดเลือดแดงที่ไต (Renal artery) ทั้งในสภาพปกติและในสภาพที่ขูดเยื่อบุหลอดเลือดออกไปแล้ว ขนาดกว้าง 2.3 mm. ยาว 5 mm. แช่ลงในสารละลาย 2% Glutaldehyde ใน phosphate buffer pH 7.4 เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย phosphate buffer ตัวเดียวกัน เป็นเวลา 20 นาที ทำ 2 ครั้งติดต่อกัน

นำตัวอย่างที่ล้างเสร็จแล้วมาทำให้แห้งหรือ Dehydrate ด้วย Ethanol เริ่มต้นตั้งแต่ความเข้มข้น 35%, 50%, 70%, 95% จนกระทั่งถึง absolute alcohol หรือ 100% alcohol ซึ่งจะต้อง dehydrate 2 ครั้ง การ dehydrate นี้ใช้เวลา 20 นาที ในแต่ละความเข้มข้น

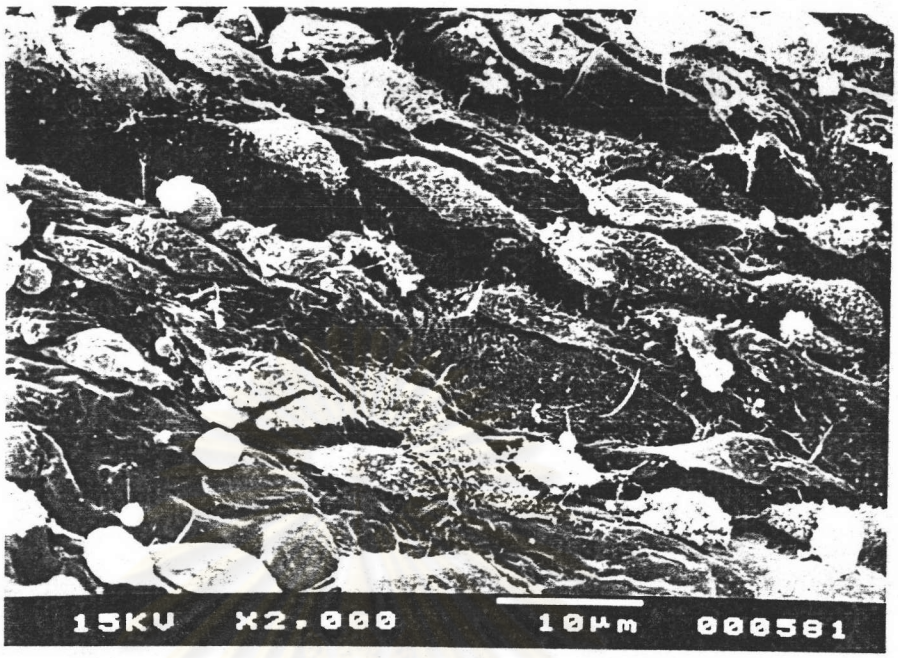
ขั้นต่อไปเป็นการกระทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต หรือ Critical Point Drying (CPD) โดยแช่ตัวอย่างลงใน absolute alcohol อีกครั้ง แล้วเก็บตัวอย่างทุกชิ้นลงใน Holder ติดชื่อของตัวอย่างไว้ใน Holder ขั้นตอนนี้จะต้องทำโดยมี absolute alcohol หล่อเลี้ยงตลอดเวลา เพื่อให้ตัวอย่างปราศจากน้ำอย่างแท้จริง หลังจากนั้นจึงนำเข้าเครื่อง CPD

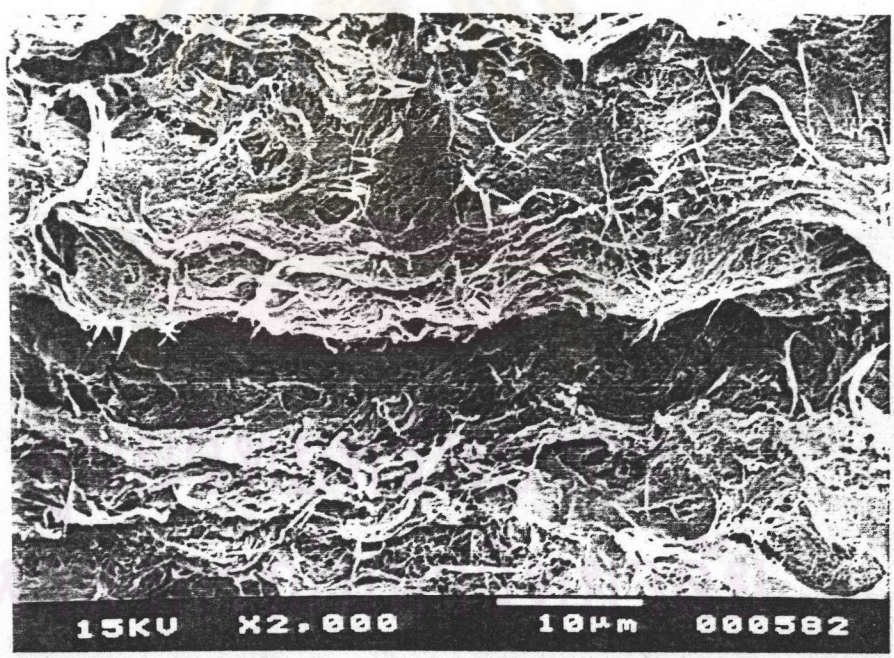
เมื่อตัวอย่างแห้งสนิทดีแล้ว จะนำไปติดบน stub เรียกขั้นตอนนี้ว่า Mount on stub โดยใช้หมึกสีดำทาที่ด้านบนของ stub ซึ่งเป็นบริเวณที่ติดตัวอย่าง หลังจากนี้จึงนำตัวอย่างไปฉาบผิวด้วยโมเลกุลทองใน sputtering unit แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope (SEM), Model JSM-T220A ของบริษัท JEOL จากรูปที่ 2.3 และ 2.4 เป็นภาพถ่ายที่ได้จากการตรวจสอบพื้นผิวของหลอดเลือดด้วย SEM โดยใช้กำลังขยาย 2,000 x ซึ่งยืนยันผลการขูดเยื่อบุผนังหลอดเลือดของหลอดเลือดแดงที่แยกจากหัวใจและไตของสุกรซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังหลอดเลือดอย่างชัดเจน





ภาพที่ 2.3 แสดงพื้นผิวด้านในของหลอดเลือดแดงที่แยกจากหัวใจของสุกรในสภาพที่มีเยื่อบุผนังหลอดเลือด (บน) และไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด (ล่าง) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (SEM) กำลังขยาย 2,000 เท่า





ภาพที่ 2.4 แสดงพื้นผิวด้านในของหลอดเลือดแดงที่แยกจากไตของสุกรในสภาพที่มีเยื่อบุผนังหลอดเลือด (บน) และไม่มีเยื่อบุผนังหลอดเลือด (ล่าง) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (SEM) กำลังขยาย 2,000 เท่า

2.3 ขั้นตอนการทำวิจัย

หลังจากเตรียมหลอดเลือดเรียบร้อยแล้ว ทำ does-response curve ของสารสื่อประสาทต่าง ๆ ตามชนิดของ receptor ตามตารางที่ 2.2 ในหลอดเลือดปกติเปรียบเทียบกับหลอดเลือดที่ขูดเยื่อบุผนังหลอดเลือดออกแล้วเปรียบเทียบถึง ED_{50} ของสารสื่อประสาทต่าง ๆ

ตาราง 2.2 แสดงแผนการทดลองตามชนิดของ Receptor

ตัวรับ (Receptor)	สารกระตุ้น (Agonist)		สารต้านฤทธิ์ (Antagonist)	
	สารสื่อประสาท	ความเข้มข้น (M)	สาร	ความเข้มข้น (M)
1. Muscarinic	Acetylcholine	10^{-4}-10^{-7}	atropine	1×10^{-6}
2. Adrenergic				
-α_1(alpha-1)	Norepinephrine	10^{-7}-10^{-4}	prazosin	1×10^{-6}
-α_2(alpha-2)	Norepinephrine	10^{-7}-10^{-4}	yohimbine	5×10^{-4}
-β (beta)	Norepinephrine	10^{-7}-10^{-4}	propranolol	1×10^{-4}
3. Serotonergic (S_2)	Serotonin (5-HT)	10^{-7}-10^{-4}	ketanserin	2.53×10^{-2}
4. Dopaminergic (DA_1)	Dopamine	10^{-8}-10^{-3}	droperidol	1×10^{-5}
			prazosin	1×10^{-6}

เนื่องจากการตอบสนองของหลอดเลือดแดงที่แยกจากหัวใจและไตมีความแตกต่างกันเมื่อได้รับสารสื่อประสาท จึงแบ่งทำการศึกษาดังนี้

2.3.1 การศึกษาบทบาทของเยื่อบุหลอดเลือดต่อการออกฤทธิ์ของสารสื่อประสาทในหลอดเลือดแดงเลี้ยงหัวใจ (Coronary artery)

- Muscarinic receptors

ทำ dose-response curve ของ acetylcholine ใช้เทคนิคการทำ cumulative dose response curve ของ Van Rossum, 1963 โดยเติมสารละลายของ acetylcholine ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดอยู่ บันทึกการหดรัดตัวของหลอดเลือดทุกครั้งที่เติมสารละลาย acetylcholine ทำเช่นนี้จนได้การหดรัดตัวสูงสุด (maximum contraction) หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์คือ Atropine 1×10^{-6} M ซึ่งจะให้ก่อนที่จะให้ acetylcholine แบบ cumulative dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที แล้วบันทึกผลการหดรัดตัว

- Adrenergic receptors

จากการพบว่า acetylcholine 1×10^{-6} M สามารถกระตุ้นให้หลอดเลือดแดงเลี้ยงหัวใจ (Coronary artery) เกิดการหดรัดตัวได้ชัดเจนจึงใช้ acetylcholine 1×10^{-6} M กระตุ้นให้หลอดเลือดเกิดการหดรัดตัวจนคงที่ก่อน จึงเริ่มทำ dose-response curve ของ Norepinephrine โดยเติมสารละลายของ Norepinephrine บันทึกการคลายตัวของหลอดเลือดทุกครั้งที่เติมสารละลาย Norepinephrine ทำเช่นนี้จนได้การคลายตัวสูงสุด (Maximum Relaxation) หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์ ซึ่งได้แก่ prazosin 1×10^{-6} , yohimbine 5×10^{-4} และ propranolol 1×10^{-4} M

ในแต่ละการศึกษา ตามตาราง 2.2 ซึ่งจะให้ก่อนที่จะให้ Norepinephrine แบบ cumulative dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที หลังจากนั้นจึงบันทึกผลการทดลอง

- Serotonergic (S_2) receptor

ทำ dose-response curve ของ Serotonin (5-Hydroxytryptamine;5-HT) โดยเติมสารละลายของ Serotonin แบบ Cumulartive dose ลงใน organ bath บันทึกการหดรัดตัวของหลอดเลือดทุกครั้งที่เติมสารละลายของ Serotonin ทำเช่นนี้จนได้การหดรัดตัวสูงสุด (Maximum Contraction) หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดถ่ายสารละลาย krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์คือ ketanserin 2.53 x 10^{-2} M ซึ่งจะให้ก่อนที่จะให้ serotonin แบบ cumulative dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที แล้วจึงบันทึกผลการหดรัดตัว

- Dopaminergic (DA 1) receptors

เนื่องจากพบว่าผลการตอบสนองของหลอดเลือดแดงที่มีต่อ Dopamine นั้นเห็นผลไม่ชัดเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อได้รับ Dopamine ในขนาดความเข้มข้นน้อย ๆ จึงใช้ KCl 15 mM กระตุ้นให้หลอดเลือดเกิดการหดรัดตัวขึ้นก่อน เมื่อการหดรัดตัวเกิดขึ้นคงที่แล้ว จึงเริ่มต้นทำ dose-response curve ของ Dopamine โดยเติมสารละลายของ Dopamine แบบ cumulative dose ลงใน organ bath บันทึกการตอบสนองของหลอดเลือดทุกครั้งที่เติมสารละลายของ Dopamine ทำเช่นนี้จนได้การหดรัดตัวสูงสุด (maximum contraction) หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์คือ Droperidol 1 x 10^{-5} M ซึ่งให้ก่อนที่จะให้สารละลายของ Dopamine แบบ cumulative dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที บันทึกผลการตอบสนองที่เกิดขึ้น

ในการศึกษาบทบาทของเยื่อบุหลอดเลือดนั้นจะทำการทดลองในหลอดเลือดปกติและหลอดเลือดที่ขูดเยื่อบุหลอดเลือดออกโดยใช้หลอดเลือดจากสัตว์ตัวเดียวกัน และทำการทดลองควบคู่กันไปตลอดจนเสร็จสิ้นการทดลอง

2.3.2 การศึกษาบทบาทของเยื่อบุหลอดเลือดต่อการออกฤทธิ์ของสารสื่อประสาทในหลอดเลือดแดงที่ไต (Renal artery)

- Muscarinic receptors

เนื่องจากพบว่า Norepinephrine 1 x 10^{-6} M สามารถกระตุ้นให้หลอดเลือดแดงที่ไต (Renal artery) เกิดการหดรัดตัวได้ชัดเจน Norepinephrine ในขนาด 1x10^{-6} M กระตุ้นให้หลอดเลือดเกิดการหดรัดตัวจนคงที่ก่อน จึงเริ่มทำ dose response curve ของ Acetylcholine โดยเติมสารละลายของ Acetylcholine บันทึกการตอบสนองของหลอดเลือดทุกครั้งที่เติมสารละลายของ Acetylcholine ทำเช่นนี้จนได้การตอบสนองสูงสุด หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์ คือ Atropine 1 x 10^{-6} M ซึ่งจะให้ก่อนที่จะให้ Acetylcholine แบบ cumulative dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที บันทึกผลการตอบสนองที่เกิดขึ้น

- Adrenergic receptors

ทำ dose-response curve ของ norepinephrine โดยเติมสารละลายของ norepinephrine ลงใน organ bath บันทึกการหดรัดตัวของหลอดเลือดทุกครั้งที่เติมสารละลายของ norepinephrine ทำเช่นนี้จนกระทั่งได้การหดรัดตัวสูงสุด (maximum contraction) หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์ ซึ่งได้แก่ prazosin 1 x 10^{-6}, yohimbine 5 x 10^{-4} และ propranolol 1 x 10^{-4} M ในแต่ละการศึกษา

ตามตาราง 2.2 ซึ่งให้ก่อนที่จะเติม norepinephrine แบบ cumulative dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที หลังจากนั้นจึงบันทึกผลการทดลอง

- Serotonergic (S2) receptors

ทำ dose-response curve ของ serotonin (5-Hydroxytryptamine ; 5-HT) โดยเติมสารละลายของ serotonin แบบ cumulative dose ลงใน organ bath บันทึกการหดรัดตัวของหลอดเลือดทุกครั้งที่เติมสารละลายของ serotonin ทำเช่นนี้จนได้การหดรัดตัวสูงสุด (Maximum contraction) หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์ คือ Ketanserin 2.53×10^{-2} M ซึ่งจะให้ก่อนที่จะให้ serotonin แบบ cumulative dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที แล้วจึงบันทึกผลการหดรัดตัว

- Dopaminergic (DA-1) receptors

ก่อนที่จะทดสอบฤทธิ์ของ Dopamine ที่มีต่อหลอดเลือดจะทำการกระตุ้นให้หลอดเลือด มีการหดรัดตัวอย่างคงที่ก่อนด้วย KCL 15 mM หลังจากนั้นจึงเริ่มต้นทำ dose-response curve ของ Dopamine โดยเติมสารละลายของ Dopamine แบบ cumulative dose ลงใน organ bath บันทึกการตอบสนองของหลอดเลือดทุกครั้งที่เติมสารละลายของ Dopamine ทำเช่นนี้จนได้การหดรัดตัวสูงสุด (maximum contraction) หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์ตัวที่หนึ่งคือ Droperidol 1×10^{-6} M ซึ่งให้ก่อนที่จะให้สารละลายของ Dopamine แบบ cumulative dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที บันทึกผลการตอบสนองที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้งปล่อยให้หลอดเลือดพักประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองโดยให้สารต้านฤทธิ์ตัวที่สองคือ Prozosin 1×10^{-6} M ซึ่งให้ก่อนที่จะให้สารละลายของ Dopamine

แบบ cumulatine dose เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที บันทึกผลการตอบสนองที่เกิดขึ้น

2.4 <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

การประเมินผลการทดลอง ทำโดยวัดขนาดของการหดรัดตัวและการคลายตัวของหลอดเลือดเป็น มม. แล้วคำนวนเป็นเปอร์เซนต์ของ maximum response (maximum contraction หรือ maxinum relaxation) ซึ่งให้มีค่าเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ค่าที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย + ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean + S.E.) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟ ให้เปอร์เซนต์ของ maximum contraction อยู่บนแกนตั้งและ log dose อยู่บนแกนนอนทดสอบความแตกต่างของการตอบสนองระหว่างหลอดเลือดปกติกับหลอดเลือดที่ขูดเอาเยื่อบุหลอดเลือดออกไปของหลอดเลือดแดงที่แยกจากไตและหัวใจ โดยใช้วิธีทางสถิติคือ student's paired t-test และทดสอบความแตกต่างของข้อมูลทั้ง 4 กลุ่ม โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one - way analysis of Variance : ANOVA)

การคำนวนหาความเข้มข้นของสารสื่อประสาท ที่ทำให้เกิดการตอบสนอง 50% (EC 50) หาได้จากกราฟ dose concentration-response

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย