บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

Materials เครื่องมือ สารเคมี และแก๊ส

1. Materials

สายสะดือของทารกที่ได้จากมารดาตั้งครรภ์ครบกำหนดที่มีสุขภาพดี จากห้องคลอดโรงพยาบาลวชิรพยาบาล กรุงเทพมหานคร

2. เครื่องมือ

2.1 organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วย หลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (Physiological solution) ที่มีความจุ 20 มิลลิลิตร และมีช่องเปิดให้แก๊ส cobogen ผ่านเข้าไปได้ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนซึ่งส่งมาจาก water bath โดยผ่าน thermoregulating water pump คอยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ ดังแสดงในรูปที่ 8

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 และ isotonic transducer ของบริษัท Harvard

2.4 เครื่องบันทึกผลการทดลอง Universal oscillograph ของบริษัท Harvard

2.5 เครื่องบันทึกผลการทดลองพร้อมขยายสัญญาณไฟฟ้า Gilson N_2 ของบริษัท Harvard

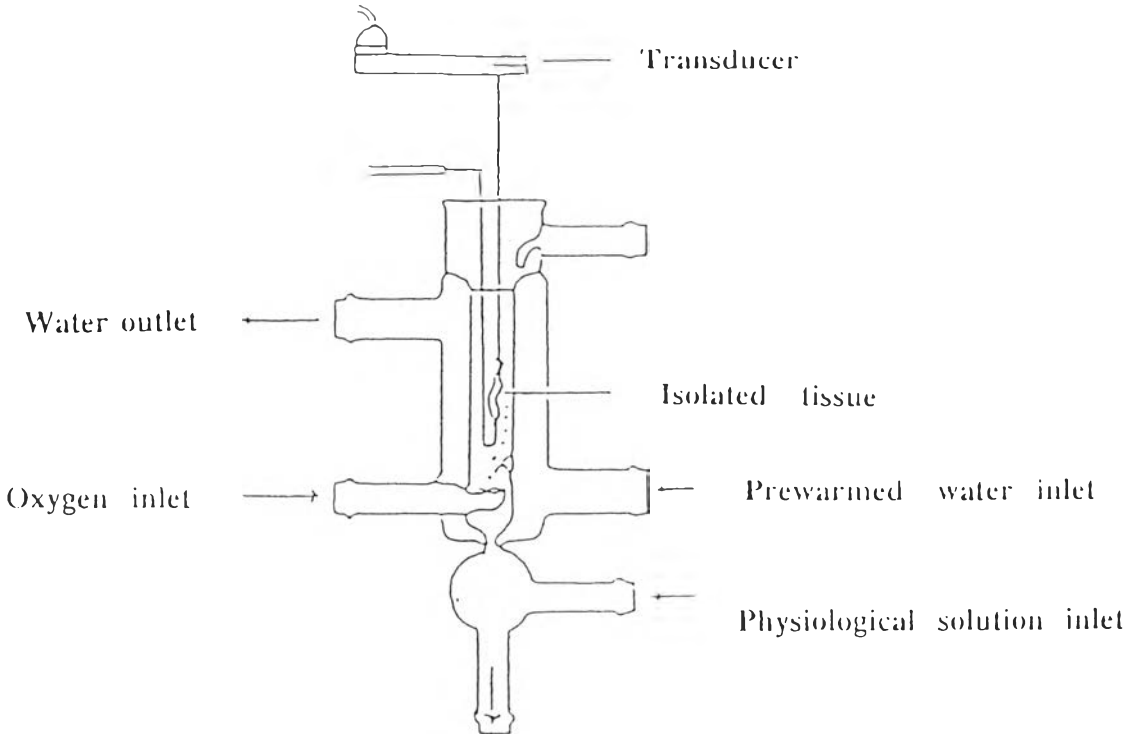
2.6 เครื่องมือผ่าตัด micro surgery instruments

2.7 เครื่องชั่งละเอียด Mettler AJ 180

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือด

- 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex (Sigma)
- histamine dihydrochloride (Sigma)
- acetylcholine chloride (Sigma)
- (-) artesenol [(-) norepinephrine bitartrate] (sigma)



รูปที่ 8 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลองกับหลอดเลือดที่สายสะดือมนุษย์

3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นสารยับยั้งมาตรฐาน

- Ketanserin tartrate (Janssen Pharmaceutica)
- Chlorpheniramine maleate (Atlantic)

3.3 สารทดลอง

- Piperine (Sigma) ละลายใน ethanol
- Andrographolide จากภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ละลายใน methyl alcohol
- Rohitukine จากภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ละลายในน้ำ

3.4 สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารทดลอง

- absolute ethanol (E. MERK)
- methyl alcohol (Carlo ERBA)

4. แก๊ส

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

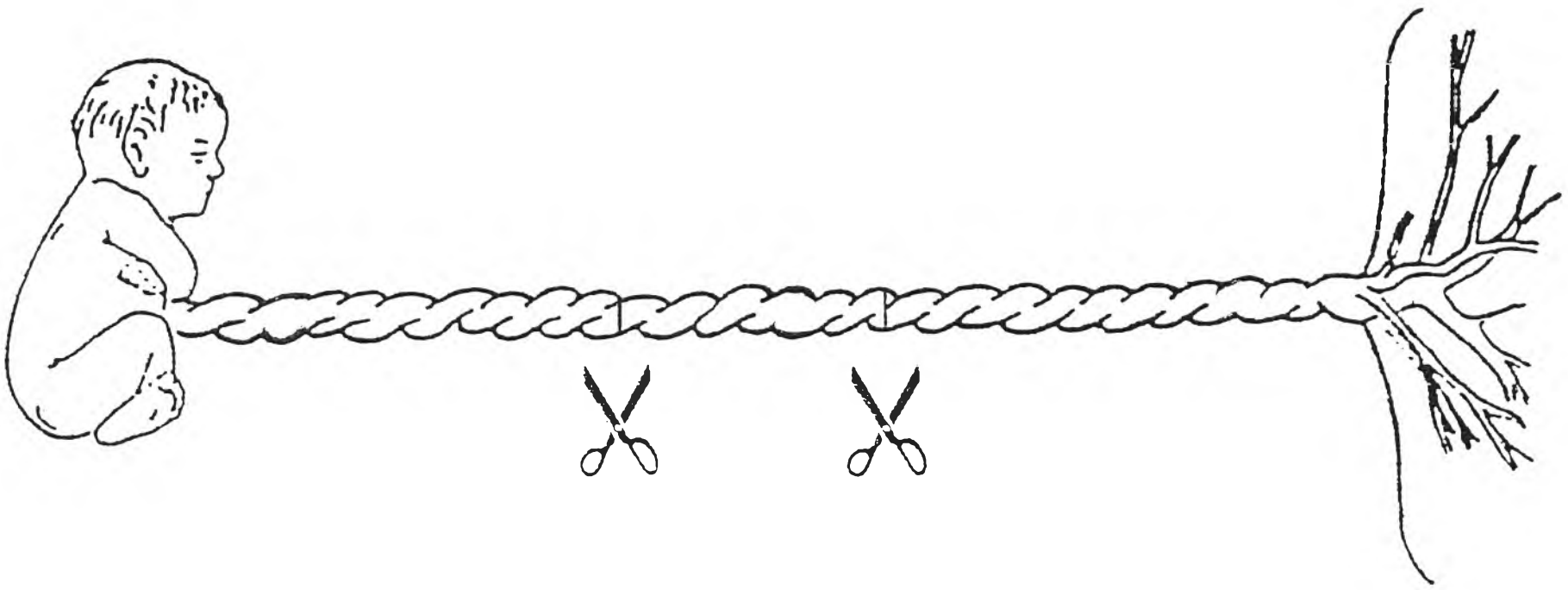
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำที่สายสะดือของมนุษย์

นำสายสะดือของทารกที่ได้จากมารดาตั้งครรภ์ครบกำหนดที่มีสุขภาพดี คลอดเองทางช่องคลอด โดยไม่ได้กำหนดอายุของมารดา และต้องปราศจากโรค ดังต่อไปนี้ ความดันโลหิตสูง, เบาหวาน, เยื่อบุโพรงมดลูกอักเสบ, โรคเลือด, โรคไวรัสตับอักเสบบี, โรคเอดส์ และในระยะตั้งครรภ์ 2 เดือนสุดท้าย จะต้องไม่ได้รับยา antihistamine, morphine, adrenergic blocker และ anticholinergic โดยสามารถทราบจากใบบันทึกการฝากครรภ์และการซักประวัติการใช้ยา นอกจากนี้ทารกที่คลอดออกมาจะต้องมี ค่าของ Apgar Score อยู่ในช่วง 8-10 คะแนน จะตัดสายสะดือหลังจากรกคลอดแล้วทันที โดยจะตัดสายสะดือส่วนตรงกลางระหว่างส่วนของรกกับส่วนของทารก (ดังรูปที่9) ให้มีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร รีบนำมาแช่ในสารละลาย Krebs-Henseleit (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1) ที่บรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิเมตรที่ผ่าน carbogen gas นาน 30 นาที PH 7.35-7.55 อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมายังห้องปฏิบัติการ

2. การเตรียมหลอดเลือดเพื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ

นำสายสะดือที่ตัดเก็บไว้แล้วใน flask มาตัดให้ได้ความยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร แยกใส่ใน petri dish ซึ่งบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit โดยมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา เตรียมหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำที่สายสะดือโดยตัดเลาะเอา



รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งการตัดสายสะดือส่วนที่จะนำมาทำการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย Krebs-Henseleit ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสารละลายที่ใช้ (mM/L.)	Krebs-Henseleit solution
sodium chloride	118.00
potassium chloride	4.70
magnesium sulfate	1.64
calcium chloride	2.52
sodium bicarbonate	24.88
potassium dibasicphosphate	1.18
glucose	11.10
purified water qs.	1 L.

wharton's jelly และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด (connective tissue) ด้วย microdissecting instruments ได้หลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำที่สายสะดือ หลอดเลือดแดงนำมาตัดแบบ longitudinal strips ส่วนหลอดเลือดดำนำมาตัดแบบ helical strips โดยให้มีความยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร (Altura et al., 1972) ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน โดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปใส่ใน organ bath ที่ภายในบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผ่าน carbogen gas ตลอดเวลา ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลองโดย thermoregulating water pump สูบน้ำไหลเวียนจาก water bath กับ organ bath ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งใช้ด้ายผูกติดกับ isometric transducer และ isotonic transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล Universal oscillograph และขยายสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณไฟฟ้า แล้วดึงหลอดเลือดให้มีแรงดึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม equilibrate หลอดเลือดประมาณ 120-180 นาที จนหลอดเลือดมีแรงดึงคงที่ ในระหว่างนี้จะเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที หลังจากนั้นจึงเริ่มทำการทดลอง

3. การทำวิจัย

3.1 การศึกษาการออกฤทธิ์ของ 5-HT, histamine, ACh, NE ต่อหลอดเลือดที่สายสะดือมนุษย์

3.1.1 ศึกษาผลของ 5-HT ต่อหลอดเลือดที่สายสะดือ

incubate หลอดเลือดที่สายสะดือในสารละลาย Krebs-Henseleit จนหลอดเลือดมีแรงดึงคงที่ ให้ 5-HT ขนาด $2x10^{-6}$M(single dose)บันทึกผลการทดลอง

3.12 ศึกษาผลของ histamine ต่อหลอดเลือดที่สายสะดือ

incubate หลอดเลือดที่สายสะดือในสารละลาย Krebs-Henseleit จนหลอดเลือดมีแรงดึงคงที่ ให้ histamine ขนาด $2x10^{-6}$M (single dose) บันทึกผลการทดลอง

3.13 ศึกษาผลของ ACh ต่อหลอดเลือดที่สายสะดือ

incubate หลอดเลือดที่สายสะดือในสารละลาย Krebs-Henseleit จนหลอดเลือดมีแรงดึงคงที่ ให้ ACh ขนาด $2x10^{-6}$ M (single dose) บันทึกผลการทดลอง

3.1.4 ศึกษาผลของ NE ต่อหลอดเลือดที่สายสะดือ

incubate หลอดเลือดที่สายสะดือในสารละลาย Krebs-Henseleit จนหลอดเลือดมีแรงดึงคงที่ ให้ NE ขนาด $2x10^{-6}$ M (single dose) บันทึกผลการทดลอง

3.2 การศึกษาผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่สายสะดือมนุษย์ โดยใช้สารกระตุ้นการหดตัว 5-HT และ histamine

3.2.1 กระตุ้นด้วย 5-HT

เมื่อ incubate หลอดเลือดที่สายสะดือด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดที่สายสะดือให้หดตัวโดยใช้ 5-HT ขนาดความเข้มข้น $2x10^{-6}$ M แบบ single dose นานประมาณ 10 นาที ให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุดเป็นกลุ่มควบคุม (Control) หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลายๆ ครั้ง โดย incubate หลอดเลือดต่อนานประมาณ 45 นาที ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที เมื่อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่แล้วจึงให้ methanol 20 ไมโครลิตร นาน 10 นาทีก่อน แล้วจึงให้ 5-HT ขนาดเท่าเดิมเป็นกลุ่มควบคุมของตัวทำละลาย (Control methanol) หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit อีก incubate ต่อไปจนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่จึงให้สารแอนโดรกราโฟไลด์ขนาดความเข้มข้น $3x10^{-5}$ M และ $3x10^{-4}$ M ก่อน 10 นาทีแล้วให้ 5-HT ขนาดเท่าเดิม สังเกตผลการทดลองที่ได้ เปรียบเทียบผลการทดลองในกลุ่ม Control, Control methanol และกลุ่มที่ให้สารแอนโดรกราโฟไลด์

3.2.2 กระตุ้นด้วย histamine

ศึกษาผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่สายสะดือ โดยใช้ histamine ขนาดความเข้มข้น $2x10^{-6}$ M แบบ single dose ซึ่งได้ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับข้างต้น โดยการเปลี่ยนสารกระตุ้นการหดตัวจาก 5-HT มาเป็น histamine

3.3 การศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่สายสะดือมนุษย์โดยใช้สารกระตุ้นการหดตัว 5-HT และ histamine

3.3.1 กระตุ้นด้วย 5-HT

เมื่อ incubate หลอดเลือดที่สายสะดือ ด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดที่สายสะดือให้หดตัวโดยใช้ 5-HT ขนาดความเข้มข้น $2x10^{-6}$ M แบบ single dose นานประมาณ 10 นาที ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุดเป็นกลุ่มควบคุม (Control) ล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง โดย incubate หลอดเลือดต่อนานประมาณ 45 นาที ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที เมื่อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่แล้วจึงให้ ethanol 10 และ 20 ไมโครลิตร นาน 10 นาทีก่อนแล้วจึงให้ 5-HT ขนาดเท่าเดิมเป็นกลุ่มควบคุมของตัวทำละลาย (Ccntrol ethanol) หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit อีก incubate ต่อไปจนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่จึงให้สารไปเปอรีน ขนาด $1.5x10^{-5}$ M และ $3x10^{-5}$ M ไปก่อน 10 นาที แล้วให้ 5-HT ขนาดเท่าเดิม สังเกตุผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบผลการทดลองในกลุ่ม control, control ethanol และกลุ่มที่ให้สารไปเปอรีน

3.3.2 กระตุ้นด้วย histamine

ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับข้างต้น โดยเปลี่ยนสารกระตุ้น การหดตัว จาก 5-HT มาเป็น histamine ขนาด $2x10^{-6}$ M

3.4 การศึกษาผลของสาร โรฮิตูคีน ต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่สายสะดือมนุษย์โดยใช้สารกระตุ้นการหดตัว 5-HT และ histamine

3.4.1 กระตุ้นด้วย 5-HT

เมื่อ incubate หลอดเลือดที่สายสะดือด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดที่สายสะดือให้หดตัวโดยใช้ 5-HT ขนาดความเข้มข้น $2x10^{-6}$ M แบบ single dose นานประมาณ 10 นาที ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุดเป็นกลุ่มควบคุม (control) ล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit หลาย ๆ ครั้ง โดย incubate หลอดเลือดต่อนานประมาณ 45 นาที ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที เมื่อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่แล้ว จึงให้สารโรฮิตูคีน ขนาด $3x10^{-5}$ M และ $3.69x10^{-4}$ M ไปก่อน 10 นาที แล้วจึงให้ 5-HT ขนาดเท่าเดิม สังเกตผลการทดลองที่ได้ เปรียบเทียบผลการทดลองในกลุ่ม control และกลุ่มที่ให้สารโรฮิตูคีน

3.4.2 กระตุ้นด้วย histamine

ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับข้างต้น โดยเปลี่ยนสารกระตุ้นการหดตัวจาก 5-HT มาเป็น histamine ขนาด $2x10^{-6}$ M

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองประเมินโดยการวัดการหดตัวของหลอดเลือด นำผลที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ โดยให้การหดตัวด้วยสารกระตุ้นมาตรฐานมีค่าสูงสุดเป็น 100% รายงานผลการทดลองที่ได้ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ student 's paired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < .05$)