บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินวิจัย

<u>Samples เครื่องมือ สารเคมี และก๊าซ</u>

1. <u>Samples</u>

สายสะดือของทารกที่ได้จากสตรีตั้งครรภ์ครบกำหนด และมีสุขภาพดี จากห้องคลอด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2. <u>เครื่องมือ</u>

2.1 Organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่ใช้หล่อเลี้ยงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) มีความจุ 20 มิลลิลิตร และมีช่องเปิดให้ก๊าซ carbogen (CO_2 5% + O_2 95%) ผ่านเข้าไปได้ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนซึ่งส่งมาจาก water bath โดยผ่าน thermoregulating water pump ที่ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ที่ 37 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาทำการทดลอง

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 เครื่องบันทึกผลการทดลองพร้อมขยายสัญญานไฟฟ้า Gilson N_2 ของบริษัท Harvard

2.6 เครื่องมือผ่าตัดเล็ก

2.7 เครื่องชั่งละเอียด Mettler AJ 180

3.<u>สารเคมี</u>

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

- Magnesium sulphate

4.ก๊าซ

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

วิธีดำเนินการวิจัย

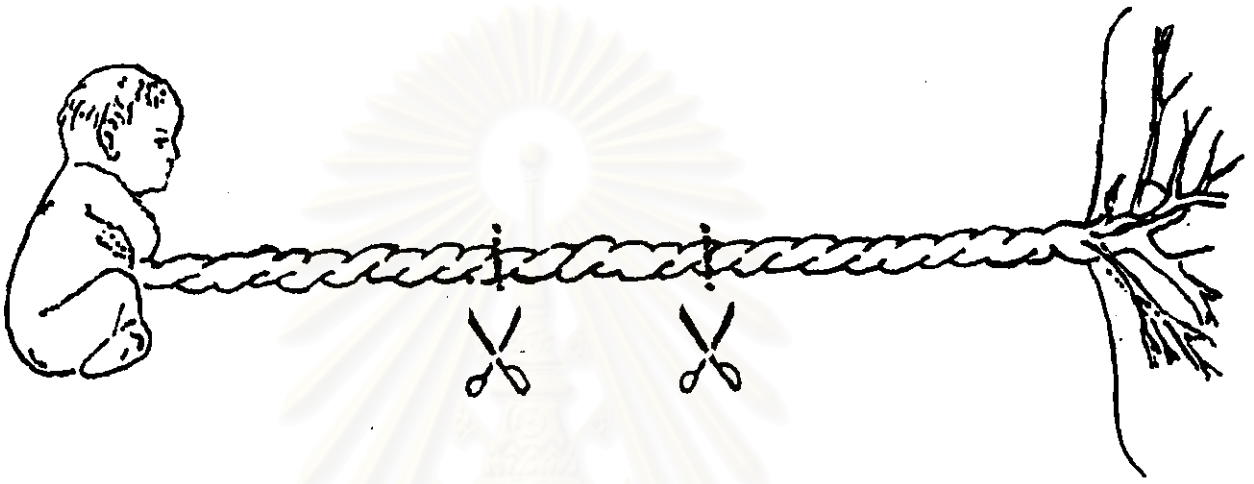
1. การเก็บหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงที่สายสะดือของมนุษย์

เตรียมสารละลาย Krebs-Henseleit บรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอัด carbogen gas นาน 30 นาที pH 7.35-7.55 อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นำมายังห้องคลอด ตัดสายสะดือของทารกที่ได้จากสตรีตั้งครรภ์ครบกำหนดและมีสุขภาพดี โดยจะตัดสายสะดือหลังจากที่รกคลอดทันที ตัดส่วนกลางระหว่างส่วนของรกกับส่วนของทารก ให้มีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร ดังรูปที่ 5 นำมาแช่ใน flask ที่บรรจุ Krebs-Henseleit Solution

2. การเตรียมหลอดเลือดสายสะดือเพื่อทดลอง

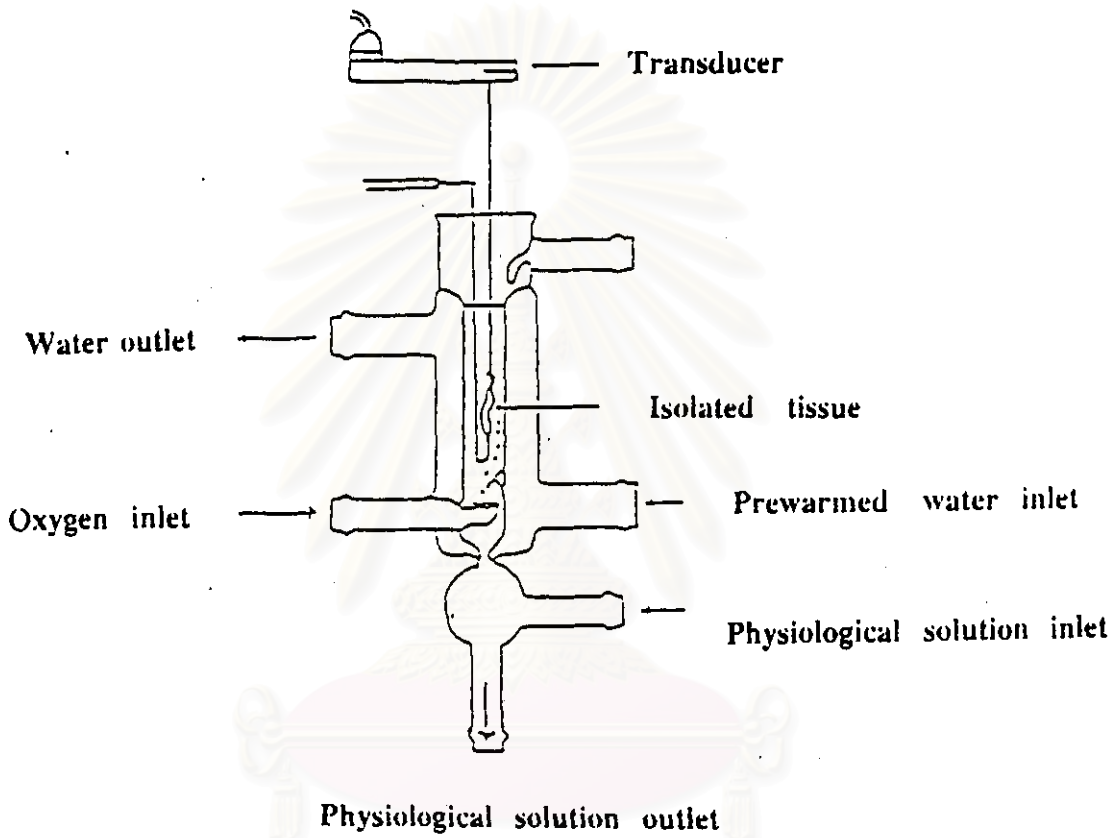
นำสายสะดือที่เก็บมาได้ ตัดให้มีความยาวพอควร วางใน petri dish ที่บรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit โดยมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา เลาะสายสะดือด้วยเครื่องมือผ่าตัดเล็ก นำเอา Wharton's jelly ออก จะพบหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก 2 เส้น และหลอดเลือดดำซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า 1 เส้น สำหรับหลอดเลือดแดงนำมาตัดแบบ longitudinal strips (Altura et al., 1972) ส่วนหลอดเลือดดำนำมาตัดแบบ ring แต่ละ ring มีความยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร (ใช้ 2 อัน) (Simon et al., 1995) ใช้ด้ายผูกติดกัน หลังจากนั้นใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ด้าน โดยปลายข้างหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ใน organ bath ที่บรรจุ Krebs-Henseleit solution 20 มิลลิลิตร มี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ประมาณ 37 องศาเซนเซียส ส่วนปลายเชือกอีกด้านหนึ่งต่อกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผลและเครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้า โดยดึงหลอดเลือดให้มีแรงตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม ใช้เวลา incubate หลอดเลือดประมาณ 90-120 นาที และเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุก ๆ 15 นาที จนกระทั่งมีความตึงตัวคงที่ โดยสังเกตุจาก base line คงที่

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดงตำแหน่งการตัดสายสะดือมนุษย์ที่นำมาทำการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับการทดลองกับหลอดเลือดสายสะดือมนุษย์

3. <u>การทำการวิจัย</u>

3.1. ศึกษาผลของสารกระตุ้นมาตรฐาน คือ 5-HT และ histamine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดสายสะดือของมนุษย์

3.1.1 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงให้มีความตึงตัวคงที่แล้ว ใส่สารกระตุ้นมาตรฐาน 5-HT ขนาด $1x10^{-6}$ M จนหดตัวได้สูงสุด ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวนานประมาณ 30 นาที บันทึกผล

3.1.2 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงให้มีความตึงตัวคงที่แล้ว ใส่สารกระตุ้นมาตรฐาน histamine ขนาด $1x10^{-5}$ M จนหดตัวได้สูงสุด ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวนานประมาณ 30 นาที บันทึกผล

3.2. ศึกษาผลของ magnesium sulphate ต่อหลอดเลือดสายสะดือ

3.2.1 ศึกษาผลของ magnesium sulphate ต่อการกระตุ้นหลอดเลือดสายสะดือให้หดตัว โดยสารกระตุ้นการหดตัว 5-HT และ histamine ในสารละลาย Krebs-Henseleit solution

3.2.1.1 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดง ในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนกระทั่งมีความตึงตัวคงที่แล้ว ให้ 5-HT ขนาด $1x10^{-6}$ M จนกระทั่งหลอดเลือดหดตัวสูงสุด ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวนานประมาณ 30 นาที บันทึกผล (เป็นกลุ่มควบคุม) หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีความตึงตัวเท่าเดิม แล้วกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วย 5-HT ขนาดเท่าเดิม จนเกิดการหดตัวสูงสุด ให้ magnesium sulphate ขนาด $1x10^{-2}$ M ทิ้งไว้ 30 นาที บันทึกผลการทดลอง

ทำการทดลองเช่นเดียวกันเปลี่ยนขนาดของ magnesium sulphate เป็น 2×10^{-2} M บันทึกผลการทดลอง

3.2.1.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1.1 แต่เปลี่ยนสารมาตรฐานที่ใช้กระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดเป็น histamine ขนาด $1x10^{-5}$ M บันทึกผลการทดลอง

3.2.2 ศึกษาผลของ magnesium sulphate ต่อการต้านการหดตัวของหลอดเลือดสายสะดือเมื่อกระตุ้นการหดตัว โดยสารกระตุ้นการหดตัว 5-HT และ histamine ในสารละลาย Krebs-Henseleit solution

3.2.2.1 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนกระทั่งมีความตึงตัวคงที่แล้ว ให้ 5-HT ขนาด $1x10^{-6}$ M จนกระทั่งหลอดเลือดหดตัวสูงสุด (เป็นกลุ่มควบคุม) หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีความตึงตัวเท่าเดิม แล้วให้ magnesium sulphate ขนาด $1x10^{-2}$ M ลงไปก่อนประมาณ 5 นาที แล้วให้ 5-HT ขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการหดตัวของ 5-HT สูงสุด เมื่อมีและไม่มี magnesium sulphate

ทำการทดลองเช่นเดียวกันเปลี่ยนขนาดของ magnesium sulphate เป็น 2×10^{-2} M บันทึกผลการทดลอง

3.2.2.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.2.1 แต่เปลี่ยนสารมาตรฐานที่ใช้กระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดเป็น histamine ขนาด $1x10^{-5}$ M บันทึกผลการทดลอง

3.2.3 ศึกษาผลของ magnesium sulphate ต่อการต้านการหดตัวของหลอดเลือดสายสะดือ ด้วยสารกระตุ้นการหดตัว 5-HT และ histamine ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution

3.2.3.1 เมื่อ incubate หลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดง ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution จนแถบหลอดเลือดมีความตึงตัวคงที่แล้ว ให้ 5-HT ขนาด $1x10^{-6}$ M จนกระทั่งหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด ปล่อยให้หดตัวนาน 30 นาที บันทึกผล (เป็นกลุ่มควบคุม) หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีความตึงตัวเท่าเดิม หลังจากนั้นให้ magnesium sulphate ขนาด $1x10^{-2}$ M ลงไปก่อนประมาณ 5 นาที แล้วให้ 5-HT ขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง การหดตัวของ 5-HT สูงสุดเมื่อมีและไม่มี magnesium sulphate

ทำการทดลองเช่นเดียวกันเปลี่ยนขนาดของ magnesium sulphate เป็น 2×10^{-2} M บันทึกผลการทดลอง

3.2.3.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 แต่เปลี่ยนสารกระตุ้นมาตรฐานที่ใช้กระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดเป็น histamine ขนาด $1x10^{-5}$ M บันทึกผลการทดลอง

3.2.4 ศึกษาผลของ magnesium sulphate ต่อการกระตุ้นหลอดเลือดสายสะดือให้หดตัวด้วย calcium chloride ($CaCl_2$) ในสารละลาย potassium depolarizing

เตรียมหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำ incubate ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution จนแถบหลอดเลือดมีความตึงตัวคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลายจาก Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution เป็นสารละลาย potassium depolarizing แล้ว incubate หลอดเลือดต่อจนมีความตึงตัวคงที่ ศึกษาผลของการหดตัวของหลอดเลือด โดยให้ $CaCl_2$ แบบสะสม ขนาด 10^{-4}, $5x10^{-4}$, 10^{-3} และ $5x10^{-3}$ M ตามลำดับ จนหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลการทดลอง (เป็นกลุ่มควบคุม) หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีความตึงตัวคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลายเป็น potassium depolarizing incubate ต่อจนกระทั่งมีความตึงตัวคงที่ จึงศึกษาผลของ magnesium sulphate โดยให้ magnesium sulphate ขนาด $1x10^{-2}$ M ก่อน 5 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาดเท่าเดิมบันทึกผลการทดลอง

หลังจากนั้นล้าง incubate ใหม่เช่นเดิม ให้ magnesium sulphate ขนาด $2x10^{-2}$ M ก่อน 5 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการทดลอง

3.2.5 ศึกษาผลของ magnesium sulphate ต่อการกระตุ้นหลอดเลือดสายสะดือให้หดตัว โดยใช้ potassium chloride (KCl) ในสารละลาย Krebs-Henseleit solution

เตรียมหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนมีความตึงตัวคงที่ ให้ KCl ขนาด 100 mM จนหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด ปล่อยให้หดตัวนานประมาณ 30 นาที บันทึกผลการทดลอง (เป็นกลุ่มควบคุม) หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit solution ทุกๆ 15 นาที จนหลอดเลือดมีความตึงตัวคงที่เหมือนเดิม ให้ KCl ขนาด 100 mM จนหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด ให้ magnesium sulphate ขนาด $1x10^{-2}$ M ทิ้งไว้ 30 นาที บันทึกผลการทดลอง

หลังจากนั้น incubate ใหม่เช่นเดิม ให้ magnesium sulphate ขนาด $2x10^{-2}$ M ทิ้งไว้ 30 นาทีเช่นกันบันทึกผลการทดลอง

3.2.6 ศึกษาผลของ magnesium sulphate ต่อการกระตุ้นหลอดเลือดสายสะดือให้หดตัว โดยใช้ potassium chloride (KCl) ในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.5 แต่เปลี่ยนสารละลายที่ใช้จาก Krebs-Henseleit solution เป็น สารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution

3.2.7 ศึกษาผลของ magnesium sulphate ต่อการกระตุ้นให้หลอดเลือดสายสะดือหดตัว โดยใช้ barium chloride ($BaCl_2$) ในสารละลาย HCO_3^- และ Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution

เตรียมหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำ incubate ในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนมีความตึงตัวคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็น HCO_3^- และ Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution แล้ว incubate ต่อจนหลอดเลือดมีความตึงตัวคงที่แล้ว ให้ $BaCl_2$ แบบสะสมขนาด $1x10^{-3}$, $2x10^{-3}$, $4x10^{-3}$, $6x10^{-3}$, $8x10^{-3}$, $10x10^{-3}$ M ตามลำดับ แต่ละครั้งห่างกันครั้งละ 1 นาที จนหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด บันทึกผลการทดลอง (เป็นกลุ่มควบคุม) แล้วล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีความตึงตัวคงที่ โดยเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาที จนมีความตึงตัวคงที่เหมือนเดิม เปลี่ยนสารละลายเป็น HCO_3^- และ Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution จนมีความตึงตัวเท่าเดิม ให้ $BaCl_2$ แบบสะสมขนาดเท่าเดิม จนหลอดเลือดหดตัวได้สูงสุด แล้วให้ magnesium sulphate ขนาด $1x10^{-2}$ M ทิ้งไว้ 30 นาที บันทึกผลการทดลอง

หลังจากนั้น incubate ใหม่เช่นเดิม ให้ magnesium sulphate ขนาด $2x10^{-2}$ M ทิ้งไว้ 30 นาที บันทึกผลการทดลอง

4. <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u> (Data Analysis)

ผลการทดลองประเมินโดย วัดการหดตัวของหลอดเลือด นำผลที่ได้มาคำนวนเป็นเปอร์เซนต์

รายงานผลการทดลองที่ได้เป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้ ANOVA ชนิด ONE WAY กำหนดค่า $P < 0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย Standard physiological solution ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสารละลายที่ใช้ / ส่วนประกอบ (mM)	Krebs-Henseleit	Ca^{2+}-free KHS	High K^{+} depolalizing	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 sulphate	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 litre	1 litre	1 litre	1 litre