บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

สุกรไม่จำกัดเพศ น้ำหนักประมาณ 90-100 กิโลกรัม จากโรงฆ่าสัตว์บางแค กรุงเทพมหานคร

2. เครื่องมือ

2.1 organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) ที่มีความจุ 25 มิลลิลิตร และมีช่องเปิดให้แก๊ส carbogen (95%O_2 + 5%CO_2) ผ่านเข้าได้ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนซึ่งส่งมาจาก water bath โดยมี thermoregulating water pump ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ตลอดเวลาทำการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 8

2.2 water bath ชนิด Thermo bath model SCBI พร้อม thermoregulating water pump model 2E-NY ของบริษัท Little giant pump

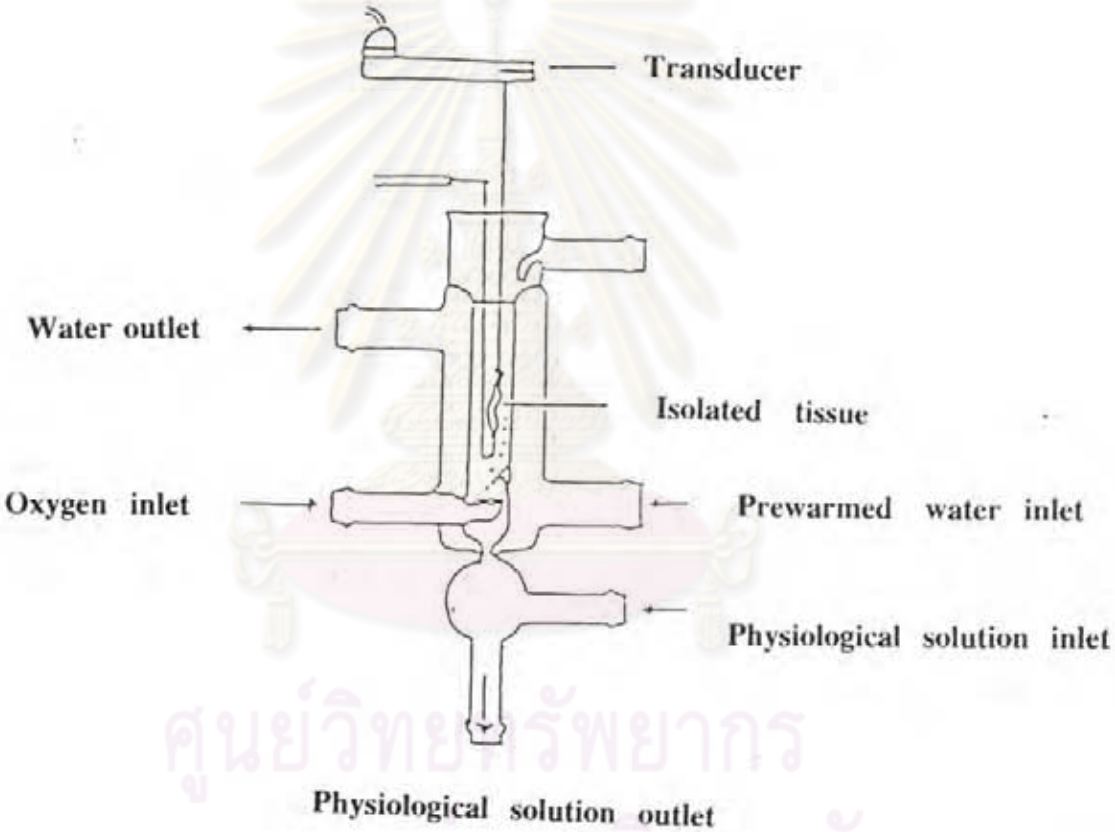
2.3 เครื่องวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ isometric transducer ของบริษัท Harvard

2.4 เครื่องบันทึกผลการทดลอง Universal oscillograph ของ Washington 4 OO MD 2C Oscillograph Bioscience Sheerness, Kent U.K.

2.5 เครื่องบันทึกผลการทดลองพร้อมขยายสัญญาณไฟฟ้า Kipp & Zonen type : BD 112, Holland

2.6 เครื่องชั่งละเอียด Mettler AJ180

2.7 ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก



รูปที่ 8 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลองกับหลอดเลือดแดงของสุกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือด

- acetylcholine chloride (Sigma)
- 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex (Sigma)
- (-) arterenol [(-) norepinephrine bitartrate] (Sigma)
- barium chloride (May & Baker)
- calcium chloride (Sigma)
- potassium chloride (Sigma)

3.2 สารทดลอง

piperine (Sigma)

3.3 สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารทดลอง

absolute ethanol (E. Merck)

4. แก๊ส

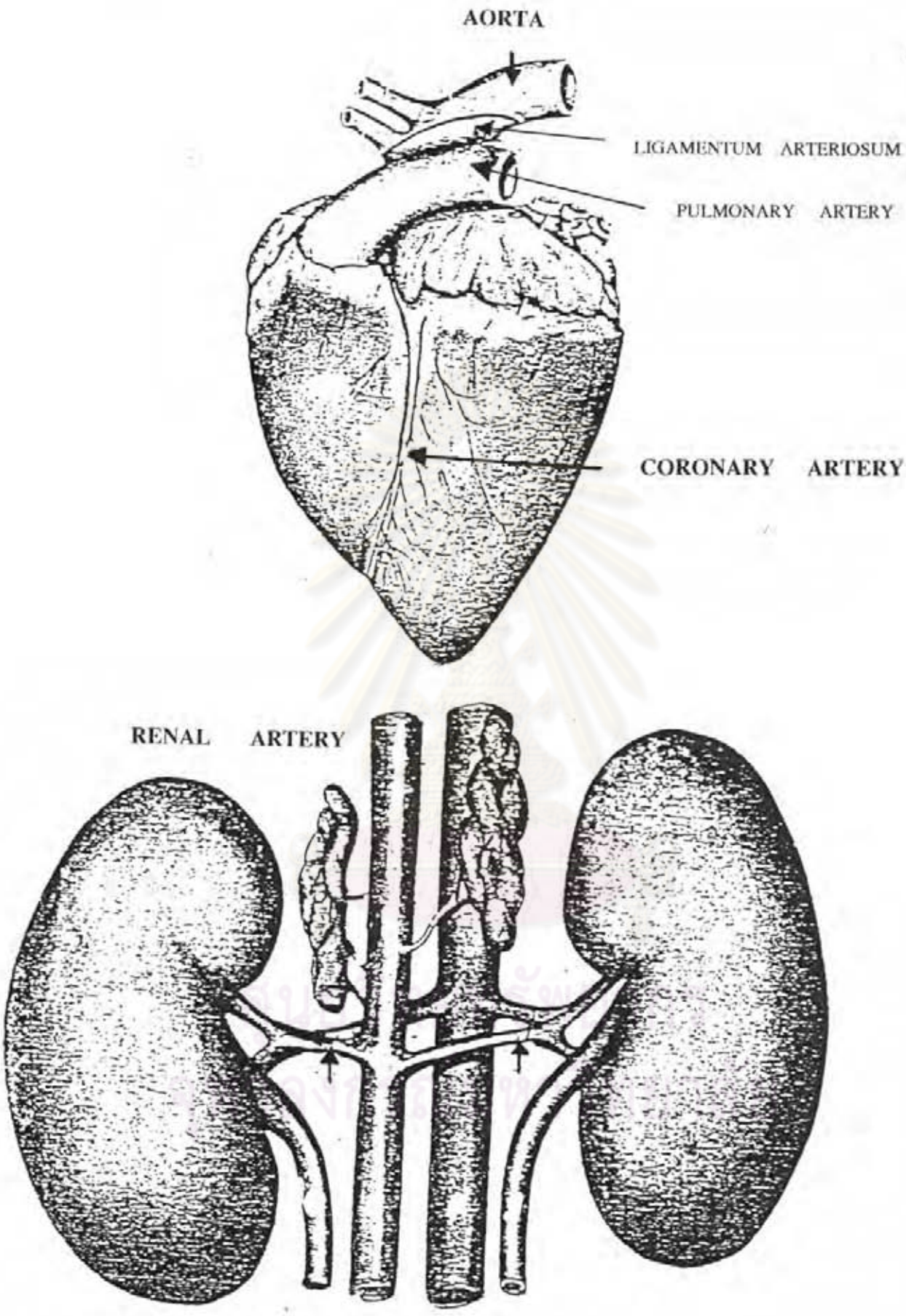
carbogen (95% O_2 + 5% CO_2)ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมหลอดเลือด

1.1 การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) จากหัวใจของสุกร

นำอวัยวะบริเวณช่องอกของสุกร ซึ่งถูกฆ่าตามกรรมวิธีของโรงฆ่าสัตว์ ภายใน 20 นาที แยกเอาหัวใจค่อย ๆ เลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยสังเกตจากหลอดเลือดแดงที่แยกออกมาจากหัวใจห้องบนซ้าย จะพบว่ามี Left pulmonary artery ยึดติดกับ arch of aorta โดย ligamentum arteriosum ตัดหลอดเลือดส่วน ascending aorta (ดังรูปที่ 9) ให้มีความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร นำมาแช่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit solution (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2) ประมาณ 150 มิลลิลิตร ที่ผ่านแก๊ส carbogen นาน 5 นาที (pH 7.35-7.45) อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมายังห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งของหลอดเลือดแดงใหญ่ หลอดเลือดแดงที่แยกจากหัวใจ และไตของสุกร

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย standard physiological ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสารละลายที่ใช้ องค์ประกอบ (mM/lt.)	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	2.52	–	–	–
sodium bicarbanate	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 lt.	1 lt.	1 lt.	1 lt.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การเตรียมหลอดเลือดแดง (coronary artery) ที่แยกจากหัวใจของสุกร

นำอวัยวะบริเวณช่องอกของสุกร ซึ่งถูกฆ่าตามกรรมวิธีของโรงฆ่าสัตว์ภายใน 20 นาที แยกเอาหัวใจค่อย ๆ เลาะหลอดเลือดแดงที่เลี้ยงหัวใจ (coronary artery) จากบริเวณ proximal left anterior descending โดยสังเกตจากหลอดเลือดแดงที่แยกมาจากหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ดังแสดงในรูปที่ 9 ใช้มีดกรีดบริเวณด้านข้างของหลอดเลือดระวังไม่ทำให้หลอดเลือดฉีกขาด เลาะหลอดเลือดให้มีความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร นำมาแช่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit solution ประมาณ 150 มิลลิลิตร ที่ผ่านแก๊ส carbogen นาน 5 นาที (pH 7.35-7.45) อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นำหลอดเลือดกลับมายังห้องปฏิบัติการ

1.3 การเตรียมหลอดเลือดแดงจากไตของสุกร (renal artery)

แยกหลอดเลือดแดงจากไตของสุกร ซึ่งถูกฆ่าตามกรรมวิธีของโรงฆ่าสัตว์ เลาะเยื่อหุ้มไตออก จะพบหลอดเลือดแดงของไต (renal artery) ของสุกรชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 9โดยสังเกตจากหลอดเลือดที่แยกเป็นแขนงจากหลอดเลือดแดงใหญ่ (dorsal aorta) ซึ่งสามารถแยกหลอดเลือดแดงจากไตและหลอดเลือดดำจากไต โดยจะพบว่าผนังหลอดเลือดแดงจากไตมีความหนาและเหนียวกว่าหลอดเลือดดำจากไต ตัดหลอดเลือดแดงให้มีความยาว 3-4 เซนติเมตร แช่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit solution ประมาณ 150 มิลลิลิตรที่ผ่านแก๊ส carbogen นาน 5 นาที อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นำหลอดเลือดกลับมายังห้องปฏิบัติการ

2. การเตรียมหลอดเลือดเพื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ

นำหลอดเลือดแดงใหญ่หลอดเลือดแดงที่หัวใจและหลอดเลือดแดงที่ไตที่ ตัดเก็บบรรจุใน flask มาใส่ใน petri dish ซึ่งบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit solution โดยผ่านแก๊ส carbogen ตลอดเวลา เตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยเลาะพวกเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ออกให้หมดแล้วตัดเป็น ring ให้มีความกว้างประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ส่วนหลอดเลือดหัวใจและไต หลังจากตัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกหมดแล้ว ตัดเป็น spiral (Blatter et al, 1978) ยาวประมาณ 1.5 - 2 เซนติเมตร หลังจากนั้นใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองข้าง โดยปลายข้างหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปใส่ใน organ bath ที่ภายในบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผ่านแก๊ส carbogen ตลอดเวลาซึ่งควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ thermoregulating water pump สูบน้ำไหลเวียนจาก water bath กับ organ bath ส่วนปลายที่เหลืออีกข้างหนึ่งของหลอดเลือดใช้ด้ายผูกกับ isometric transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผล

Universal oscillograph และขยายสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกผลพร้อมขยายสัญญาณไฟฟ้าดึงหลอดเลือดให้มีแรงตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 0.5-0.8 กรัม equilibrate หลอดเลือดประมาณ 90-120 นาที จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ โดยสังเกตจาก baseline คงที่ ระหว่าง equilibrate เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit solution ทุก 15 นาที หลังจากนั้นจึงเริ่มการทดลอง

3. การเตรียมหลอดเลือดที่ปราศจากเยื่อบุหลอดเลือด (De-endothelium)

การทดสอบอิทธิพลของเยื่อบุหลอดเลือดทำได้ โดยการขูดเยื่อบุผนังด้านในของหลอดเลือด โดยใช้ไม้พันสำลีขูดเบา ๆ ใน petri-dish ที่มี Krebs-Henseleit solutionซึ่งผ่านแก๊ส carbogen อยู่ตลอดเวลา หลังจากนั้นนำกลับมาแช่ใน organ bath chamber ทำการ pre-incubation อย่างน้อย 90-120 นาที จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่จึงเริ่มทำการทดลอง

การยืนยันผลการทดลองในเรื่องบทบาทของ endothelium ที่มีต่อการตอบสนองนั้นโดยใช้การทดสอบด้วย ACh ขนาด $1x10^{-6}$ โมลาร์ และ Ca^{2+} - ionophore A23187 ขนาด $1x10^{-6}$ M (Furchgott and Zawadzki, 1980b) โดยหลอดเลือดที่มีเยื่อบุหลอดเลือดอยู่ด้วย จะคลายตัวได้เมื่อให้สารทดสอบดังกล่าว แต่ถ้าปราศจากเยื่อบุหลอดเลือด การคลายตัวเมื่อให้สารทดสอบดังกล่าวจะไม่เกิดขึ้น

4. การทำวิจัย

4.1 การศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อหลอดเลือดแดงที่หัวใจ (coronary artery)

4.1.1 ศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงที่หัวใจด้วยสารกระตุ้นการหดตัว ACh และ 5-HT

เมื่อ incubate หลอดเลือดจนมีแรงตึง (tension) คงที่แล้วให้ ACh แบบสะสมขนาดความเข้มข้น $1x10^{-8}$ - $1x10^{-4}$ โมลาร์ ตามลำดับ เป็น cumulative dose response curve โดยใช้วิธีการของ Van Rossum ,Hurkmans และ Wolters (1963) เป็นกลุ่มควบคุม (control) หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้ง โดย incubate หลอดเลือดนานประมาณ 30 นาที ซึ่งในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit solution ทุก 15 นาที เมื่อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่แล้วให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตร ก่อน 10 นาที แล้วให้ ACh ขนาดเท่าเดิมเป็นกลุ่มควบคุมของตัวทำละลาย (control ethanol) เนื่องจากสารที่ใช้ทดลองคือสารไปเปอรีนใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย หลัง

จากนั้นล้างหลอดเลือดแล้ว incubate ใหม่เช่นเดิมให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ M ก่อน 10 นาที แล้วให้สารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดในขนาดเท่าเดิม เปรียบเทียบผลการหดตัวทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม .control, control ethanol และกลุ่มที่ให้สารไปเปอรีน

ศึกษา dose – response curve ของสารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจโดยให้ 5 -HT แบบสะสมขนาดความเข้มข้น $1 x10^{-8}$ - $1x10^{-5}$ โมลาร์ตามลำดับ เปรียบเทียบผลของสารหดตัวของหลอดเลือดหัวใจ เมื่อให้ cumulative dose ของ 5-HT อย่างเดียว กลุ่มที่ให้ absolute ethanol ก่อน 10 นาที แล้วให้ cumulative dose ของ 5-HT และกลุ่มของสารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ที่ให้ 10 นาที ก่อนให้ cumulative dose ของ 5-HT ตามลำดับดังแสดงข้างต้น

4.1.2 ศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อการกระตุ้นหลอดเลือดแดงที่หัวใจ ให้หดตัวโดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ในสารละลาย potassium depolarizing

เตรียมหลอดเลือด incubate ในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2)โดยเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาที จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลายจาก Ca^{2+} - free Krebs Henseleit solution เป็นสารละลาย potassium depolarizing (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2) incubate หลอดเลือดจนมีแรงตึงคงที่ ศึกษาผลของการหดตัวของหลอดเลือด โดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ แบบสะสม ขนาดความเข้มข้น 0.5 , 1 , 2 , 4 มิลลิโมล ตามลำดับ หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้ง จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ incubate หลอดเลือดโดยเปลี่ยนสารละลายจาก Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution เป็นสารละลาย potassium depolarizing ให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตรก่อน 10 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสม หลังจากนั้นล้าง incubate ใหม่เช่นเดิม ให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ก่อน 10 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสมในขนาดเท่าเดิม เปรียบเทียบผลการหดตัวทั้ง 3 กลุ่ม

4.1.3 ศึกษาผลของสารไปเปอรีน ต่อการกระตุ้นหลอดเลือดแดงที่หัวใจ โดยใช้สารกระตุ้นการหดตัว เปรียบเทียบในสภาวะที่มีและไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด

4.1.3.1 กระตุ้นด้วย ACh

สภาวะที่มีเยื่อบุหลอดเลือดทดลองเตรียมหลอดเลือด โดย incubate หลอดเลือดในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวด้วย ACh ขนาด $1x10^{-6}$ โมลาร์ (single dose) จนเกิดการหดตัว

สูงสุด (maximum contraction) ให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตร นาน 10 นาที แล้วให้ Ca^{2+} - ionophore A23187 $1x10^{-6}$ โมลาร์ ทดสอบเยื่อบุหลอดเลือดถ้าหลอดเลือดไม่คลายตัวตัดออกจากการทดลอง หลังจากนั้น ล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้ง incubate หลอดเลือด จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ โดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit solution ทุก 15 นาที กระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วย ACh ขนาด $1x10^{-6}$ โมลาร์ จนเกิดการหดตัวสูงสุด ให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ทิ้งไว้ 10 นาทีบันทึกผล

สำหรับผลของสารไปเปอรีน ในสภาวะที่ไม่มีเยื่อบุหลอดเลือดนั้น ทำได้โดยนำหลอดเลือดเส้นเดิมมาแช่ใน petri-dish ที่มี Krebs-Henseleit solution อยู่ผ่านแก๊ส carbogen ตลอดเวลา ใช้ไม้พันสำลีชุดเบา ๆบริเวณด้านในของหลอดเลือดระวังกล้ามเนื้อหลอดเลือดถูกทำลาย หลังจากนั้นนำกลับมาแขวนไว้ใน chamber ตามเดิม โดยปรับแรงตึงให้เท่าเดิมเหมือนเริ่มการทดลอง incubate หลอดเลือดประมาณ 120-180 นาที จนมีแรงตึงคงที่ให้ ACh ขนาด $1x10^{-6}$ โมลาร์ กระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวนานประมาณ 10 นาที ให้ Ca^{2+} - ionophore A23187 $1x10^{-6}$ โมลาร์ ทดสอบ ถ้าหลอดเลือดคลายตัว ตัดออกจากการทดลอง หลังจากนั้นให้หลอดเลือดที่ปราศจากเยื่อบุหลอดเลือดมา incubate ใหม่จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ ให้ ACh ขนาดเท่าเดิมกระตุ้น เมื่อหลอดเลือดมีการหดตัวสูงสุด ให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ นาน 10 นาที บันทึกเปรียบเทียบผลการทดลอง

4.1.3.2 กระตุ้นด้วย 5-HT

เปรียบเทียบผลของสารไปเปอรีนต่อการกระตุ้นหลอดเลือดแดงที่หัวใจ โดยการกระตุ้นหลอดเลือดด้วย 5-HT เปรียบเทียบในสภาวะที่มีและไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด ซึ่งทำการทดลองเหมือนการกระตุ้นด้วย ACh ดังกล่าวแล้วข้างต้น แต่เปลี่ยนสารกระตุ้นเป็น 5-HT แทน

4.1.4 ศึกษาผลของสารไปเปอรีน ต่อการกระตุ้นให้หลอดเลือดแดงที่หัวใจให้หดตัว โดยใช้สารละลาย $BaCl_2$ ในสารละลาย HCO_3^- และ Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution

เตรียมหลอดเลือดโดย incubate ในสารละลาย HCO_3^- และ Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution (รายละเอียดดังกล่าวในตารางที่ 2) นานประมาณ 120-180 นาที โดยเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาที จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ ให้ absolute ethanol ก่อน 10 นาที หลังจากนั้นจึงให้สารละลาย $BaCl_2$ แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8, 10 มิลลิโมล ตามลำดับ แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีแรง

ตึงคงที่ โดยเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาที เปลี่ยนสารละลายเป็น HCO_3^- และ Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution นานประมาณ 1 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาทีเช่นเดียวกัน ให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ก่อน 10 นาทีแล้วให้สารละลาย $BaCl_2$ แบบสะสม

4.1.5 ศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อการกระตุ้นให้หลอดเลือดแดงที่หัวใจให้หดตัวโดยใช้สารละลาย KCl ในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution

เตรียมหลอดเลือดโดย incubate หลอดเลือดในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตร ก่อน 10 นาที แล้วให้ KCl 100 มิลลิโมล แบบ single dose จะทำให้หลอดเลือดหดตัว ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวนานประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่เหมือนเริ่มการทดลองเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาที ให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ก่อน 10 นาที แล้วให้ KCl 100 มิลลิโมล ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวเป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบผลการทดลอง

4.2 การศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อหลอดเลือดแดงที่ไต (renal artery)

4.2.1 ศึกษาผลของสารไปเปอรีน ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงที่ไตด้วยสารกระตุ้นการหดตัว NE และ 5-HT

incubate หลอดเลือดจนมีแรงตึงคงที่ให้ NE แบบสะสมขนาดความเข้มข้น $1x10^{-8}$ - $1x10^{-4}$ โมลาร์ ตามลำดับ หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้งโดย inoubate หลอดเลือดนานประมาณ 30 นาที เมื่อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตร ก่อน 10 นาที แล้วจึงให้ NE ในขนาดเท่าเดิมแล้วล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit solution และ incubate ใหม่เช่นเดิม ให้สารไปเปอรีนขนาด 3 $x10^{-5}$ โมลาร์ก่อน 10 นาที แล้วให้สารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดในขนาดเท่าเดิมเปรียบเทียบผลการหดตัว

ศึกษา dose - response curve ของสารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดแดงที่ไตโดยให้ 5-HT แบบสะสมขนาดความเข้มข้น $1x10^{-8}$ - $1x10^{-5}$ โมลาร์ตามลำดับ เปรียบเทียบผลการหดตัวของหลอดเลือด เมื่อให้ cumulative dose ของ 5-HT อย่างเดียว กลุ่มที่ให้ absolute ethanol ก่อน 10 นาที แล้วให้ cumulative dose ของ 5-HT และกลุ่มของสารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ที่ให้ 10 นาทีก่อนให้ cumulative dose ของ 5-HT ตามลำดับดังแสดงข้างต้น

4.2.2 ศึกษาผลของสารไปเปอรีน ต่อการกระตุ้นหลอดเลือดแดงที่ไต ให้หดตัวโดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ในสารละลาย potassium depolarizing

เตรียมหลอดเลือด incubate ในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลายเป็น สารละลาย potassium depolarizing แล้ว incubate หลอดเลือดจนมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัว โดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4 มิลลิโมล ตามลำดับ หลังจากนั้น ล้างออกด้วยสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้ง จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็น potassium depolarizing ให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตรก่อน 10 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสม หลังจากนั้นล้าง incubate ใหม่เช่นเดิม ให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ก่อน 10 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสม ในขนาดเท่าเดิม เปรียบเทียบผลการทดลอง

4.2.3 ศึกษาผลของสารไปเปอรีน ต่อการกระตุ้นหลอดเลือดแดงที่ไต โดยใช้สารกระตุ้นการหดตัวเปรียบเทียบในสภาวะที่มีและไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด

4.2.3.1 กระตุ้นด้วย NE

ในสภาวะที่มีเยื่อบุหลอดเลือด incubate หลอดเลือดในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวด้วย NE ขนาด $1x10^{-6}$ โมลาร์ (single dose) จนเกิดการหดตัวสูงสุดให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตร นาน 10 นาที แล้วให้ ACh $1x10^{-6}$ โมลาร์ ทดสอบเยื่อบุหลอดเลือด หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลาย ๆ ครั้ง incubate หลอดเลือดจนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วย NE ขนาดเท่าเดิม จนเกิดการหดตัวสูงสุด ให้สารไปเปอรีน ขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ทิ้งไว้ 10 นาที สำหรับผลต่อหลอดเลือดในสภาวะที่ไม่มีเยื่อบุหลอดเลือดนั้น ทำได้โดยนำหลอดเลือดเส้นเดิมมาแช่ใน petri-dish ที่มี Krebs-Henseleit solution ผ่านแก๊ส carbogen ตลอดเวลา ใช้ไม้พันสำลีขูดเบา ๆ บริเวณด้านในของหลอดเลือด จากนั้นนำกลับมาแขวนใน chamber ตามเดิม โดยปรับแรงตึงให้เท่าเดิมเหมือนเริ่มการทดลอง incubate หลอดเลือดประมาณ 120-180 นาที จนมีแรงตึงคงที่ ให้ NE ขนาด $1x10^{-6}$ โมลาร์ กระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวประมาณ 10 นาที ให้ ACh $1x10^{-6}$ โมลาร์ ทดสอบเยื่อบุหลอดเลือด เมื่อหลอดเลือดปราศจากเยื่อบุหลอดเลือดแล้ว incubate หลอดเลือดและให้ NE ขนาดเท่าเดิมกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุดให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ นาน 10 นาที

4.2.3.2 กระตุ้นด้วย 5-HT

เปรียบเทียบผลของสารไปเปอรีน ต่อการกระตุ้นหลอดเลือดแดงที่ไตโดยการกระตุ้นหลอดเลือดด้วย 5-HT เปรียบเทียบในสภาวะที่มีและไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด ซึ่งทำการทดลองเหมือนการกระตุ้นด้วย NE ดังกล่าวข้างต้น แต่เปลี่ยนสารกระตุ้นเป็น 5-HT แทน

4.2.4 ศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อการกระตุ้นให้หลอดเลือดแดงที่ไตให้หดตัว โดยใช้สารละลาย $BaCl_2$

Incubate หลอดเลือดในสารละลาย HCO_3^- และ Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution นานประมาณ 120-180 นาที ให้ absolute ethanol ก่อน 10 นาที หลังจากนั้นจึงให้สารละลาย $BaCl_2$ แบบสะสมขนาดความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8, 10 มิลลิโมล ตามลำดับ แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็น HCO_3^- และ Ca^{2+} - free Krebs-Heuseleit solution นานประมาณ 1 ชั่วโมง โดยให้สาร ไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ก่อน 10 นาทีแล้วให้สารละลาย $BaCl_2$ แบบสะสม

4.2.5 ศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อการกระตุ้นให้หลอดเลือดแดงที่ไตให้หดตัว โดยใช้สารละลาย KCl ในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution

incubate หลอดเลือดในสารละลาย Ca^{2+} - free Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ ให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตรก่อน 10 นาที แล้ว KCl 100 มิลลิโมล แบบ single dose ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวนานประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่เหมือนเดิมการทดลองเปลี่ยนสารละลายเป็น Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution นานประมาณ 1 ชั่วโมง ให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ก่อน 10 นาที แล้วให้ KCl ขนาด 100 มิลลิโมล ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวเป็นเวลา 30 นาที

4.3 การศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta)

4.3.1 ศึกษาการออกฤทธิ์ของ ACh, NE และ 5-HT ต่อหลอดเลือดแดงใหญ่

4.3.1.1 Muscarinic receptors

incubate หลอดเลือดในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ ให้ ACh $1x10^{-6}$ โมลาร์ (single dose) ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวจนคงที่ แล้วให้สารต้านฤทธิ์คือ atropine $1x10^{-6}$ โมลาร์ บันทึกผลการทดลอง

4.3.1.2 Adrenergic receptors

incubate หลอดเลือดในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ ให้ NE ขนาด $1x10^{-6}$ โมลาร์ (single dose) ปล่อยให้หลอดเลือดหดตัวจนคงที่ แล้วให้สารต้านฤทธิ์คือ phentolamine $1x10^{-6}$ โมลาร์ บันทึกผลการทดลอง

4.3.1.3 Serotonergic receptors

incubateหลอดเลือดในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ ให้ 5-HT ขนาด $1x10^{-6}$ โมลาร์ (single dose) ปล่อยให้หลอดเลือดคลายตัวจน คลายตัวสูงสุด (maximum relaxation) บันทึกผลการทดลอง

4.3.2 ศึกษาผลของสารไปเปอรีน ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ด้วยสารกระตุ้นการหดตัว ACh และ NE

incubate หลอดเลือดในสารละลาย Krebs-Henseleit solution จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ ให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตรก่อน 10 นาที แล้วให้ ACh แบบสะสมขนาดความเข้มข้น $1x10^{-8}$ - $1x10^{-5}$ โมลาร์ ตามลำดับ หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution โดย incubate หลอดเลือดนานประมาณ 30 นาที แล้วให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ก่อน 10 นาที จึงให้สารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดในขนาดเท่าเดิม

ศึกษา dose-response curve ของสารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตรก่อน 10 นาที แล้วให้ NE แบบสะสมขนาดความเข้มข้น $1x10^{-8}$ - $1x10^{-5}$ โมลาร์ ตามลำดับ เปรียบเทียบผลของการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ ก่อน 10 นาที ก่อนให้ cumulative dose ของ NE ตามลำดับ

4.3.3 ศึกษาผลของสารไปเปอรีนต่อการกระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่ให้หดตัวโดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ในสารละลาย potassium depolarizing

incubate หลอดเลือดในสารละลาย Ca^{2+} -free Krebs-Henseleit solution จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลายเป็น potassium depolarizing แล้ว incubate หลอดเลือดจนมีแรงตึงคงที่ให้ absolute ethanol 10 ไมโครลิตร ก่อน 10 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด 1, 2, 4, 6, 8, 10 มิลลิโมล ตามลำดับ หลังจากนั้นล้าง incubate ใหม่เช่นเดิม ให้สารไปเปอรีนขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ก่อน 10 นาที แล้วให้ $CaCl_2$ แบบสะสม ในขนาดเท่าเดิม เปรียบเทียบผลการทดลอง

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองประเมินโดยการวัดการหดตัวของหลอดเลือด นำผลที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นสูงสุดเป็น maximum response มีค่าเป็น 100%

รายงานผลการทดลองที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตราฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมแอลกอฮอล์ และกลุ่มที่ได้รับสารไปเปอรีน โดยใช้ ANOVA ชนิด ONE WAY และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Dancan's new multiple range test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

การคำนวณค่า drug parameter ใช้วิธีของ Van-Rossum และคณะ (1963) โดยค่า logarithm ของ affinity ของ competitive antagonist แสดงในรูป pA_2 ส่วน non-competitive antagonist แสดงในรูป pD_2' คำนวณจากสมการได้ดังนี้

$$pA_2 = -\log[B] + \log([A_B] / [A_O] - 1)$$

เมื่อ [B] คือความเข้มข้นของ competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

$[A_B]$ และ $[A_O]$ คือความเข้มข้นของ agonist ในหน่วยโมลาร์ที่ทำให้เกิด 50% response เมื่อมีและไม่มี antagonist ตามลำดับ

$$pD_2' = -\log[B] + \log\{(E_{AM} / E_{AMB}) - 1\}$$

เมื่อ [B] คือความเข้มข้นของ non-competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

E_{AM} และ E_{AMB} คือค่าการหดตัวสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้นเมื่อไม่มีและมีสารยับยั้งอยู่ด้วย