บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 เครื่องมือ-เครื่องใช้

เครื่องชั่งละเอียด (Metler B, Type B6, No 6993)

เครื่องชั่งหยาบ (Harvard Trip Balance)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Heto type 02 T623, No 7411)

ชุด organ bath (Harvard Apparatus)

Isotonic transducer (Myograph F-60, Bio-Narco system)

Physiograph recorder (Physiograph CPM, Bio-Narco system)

ไมโครไปเปต (SMI Quick-Set Micro/Pettor)

2.1.2 ยาและเคมีภัณฑ์

สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายเป็นชนิดสำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ (analytical grade) ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

อะเซทิล์ลโคลีนคลอไรด์ อะโทรปินซัลเฟต โดปามีนไฮโดรคลอไรด์ เกลืออีสตามีนไดฟอสเฟต ไอโซโปรเทอรินอลไฮโดรคลอไรด์ นอร์อะดรีนาลีนไบตาร์เตรต ปาปาเวอรีนไฮโดรคลอไรด์ พราโซซินไฮโดรคลอไรด์ โปรปราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ และซีโรโทนินครีเอทินินซัลเฟต จากบริษัทซิกมา (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

แอลคอร์บิกแอซิด จากบริษัทบีเอ็ชดี (ประเทศอังกฤษ)

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต เอธานอล 95% โซเดียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต และ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-12-ไฮเดรต จากบริษัทเมอร์ก (ประเทศเยอรมัน)

คลอร์เฟนิรามีนมาลีเอท ของบริษัทอุดมภัณฑ์ (Phihalab ประเทศไทย)

ซัยเมทิดีน ของบริษัท แอตแลนติกฟาร์มาซูติคอล (ประเทศไทย)

เอธิลีนไดเอมีนเตตราอะซิติก (EDTA) ของบริษัท ฟลูคาเคมี (ประเทศสวิสเซอร์แลนด์)

ไฮดราลาซีน ของบริษัท จีบา-ไกกี (ประเทศสวิสเซอร์แลนด์)

คีแทนเซริน จากบริษัท แจนเซน ฟาร์มาซูติคอล (ประเทศเบลเยี่ยม)

โปแตสเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ของบริษัท เมย์แอนด์เบเคอร์ (ประเทศอังกฤษ)

เวราปามิล ของบริษัท คะนอล (ประเทศเยอรมัน)

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.2.1 การเตรียมสารละลาย physiological salt และสารละลายยา

2.2.1.1 สารละลาย physiological salt (modified Ringer solution)

การเตรียม stock solution

เตรียมดังต่อไปนี้

stock solution 1	NaCl	180	กรัม
	KCl	4	กรัม
	$CaCl_2.2H_2O$	5.3	กรัม
	เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	มล.

stock solution 2 (Phosphate buffer)

solution 1	$Na_2HPO_4.12H_2O$	7.16	กรัม
	น้ำกลั่น	500	มล.
solution 2	$NaH_2PO_4.2H_2O$	1.56	กรัม
	น้ำกลั่น	100	มล.

บรรจุ stock solution ทั้ง 1 และ 2 ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท และเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4°C การเตรียมสารละลาย modified Ringer ที่นำมาใช้ในการทดลอง ทำได้โดยการนำ stock solution 1 และ 2 มาผสมกันในปริมาณดังต่อไปนี้

stock solution 1	50	มล.
stock solution 2		
solution 1	10	มล.
solution 2	1	มล.
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	มล.

ใส่สารละลาย modified Ringer solution ใน organ bath ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37°C และให้ 100% O_2 ตลอดเวลา (pH ของสารละลายเป็น 7.4) สำหรับสารละลาย modified Ringer solution ที่ใช้ล้างเนื้อเยื่อในการทดลองเป็นสารละลายที่มีอุณหภูมิ 37°C เช่นกัน โดยการผ่าน jacket-warming coil

การเตรียม Ca^{++}-free modified Ringer solution ทำได้โดยการเตรียม 2 mM ของ EDTA ใน modified Ringer solution โดยที่ EDTA จะไปจับกับแคลเซียมอิออนในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (intracellularly bound Ca^{++})

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.1.2 สารละลายยา

ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น final concentration ในสารละลาย modified Ringer solution ใน organ bath ซึ่งคำนวณได้จาก

ในกรณีที่เป็นของแข็งคำนวณได้จากสูตร $B = \frac{A \times MW \times C}{1000} \times \frac{D}{E} \times 1000$

ในกรณีที่เป็นสารละลายคำนวณได้จากสูตร $A = \frac{B \text{ (มก./มล.)} \times 1000}{MW \times C} \times \frac{E}{D \times 1000}$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการเตรียม (M)

B = น้ำหนักของสารที่ต้องการใช้ (มก.)

C = ปริมาตรของสารละลายใน organ bath (25 มล.)

D = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการเตรียม (มล.)

E = ปริมาตรของยาเตรียมที่ฉีดเข้าไปใน organ bath

MW = น้ำหนักโมเลกุลของสารเคมี

สารละลายยาที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ประกอบด้วย

1. อะเซทิย์ลโคลีน

ชั่งอะเซทิย์ลโคลีนคลอไรด์ (MW 189.7) จำนวน 237.125 มก. มาละลายในน้ำกลั่น 10 มล. จะได้สารละลายอะเซทิย์ลโคลีนที่มีความเข้มข้น 5×10^{-4} M ซึ่งก่อนทำการทดลองนำมาเจือจางให้ได้สารละลายอะเซทิย์ลโคลีนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ $10^{-4} - 10^{-7}$ M

2. กรดแอสคอร์บิก

นำกรดแอสคอร์บิก มา 50 มก. ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. ได้สารละลายกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้น 10 มก.%

3. อะโทรปีน

ชั่งอะโทรปีน ซัลเฟต (MW 289.4) 36.175 มก. มาละลายในน้ำกลั่น จำนวน 1 มล. ได้สารละลายของอะโทรปีนที่มีความเข้มข้น 5×10^{-5} M แล้วทำการเจือจางต่อให้ได้สารละลายอะโทรปีนที่มีความเข้มข้น 5×10^{-7} M

4. แคลเซียมคลอไรด์

นำแคลเซียมคลอไรด์ (MW 147.02) มา 1.837 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. จะได้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 5×10^{-3} M แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น $10^{-3} - 10^{-7}$ M

5. คลอร์เฟนิรามีน

เจือจางยาฉีดคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอท (MW 390.9, 5 มก./มล.) 1 มล. ด้วยน้ำกลั่น 4 มล. ได้สารละลายคลอร์เฟนิรามีนที่มีความเข้มข้น 1.02×10^{-6} M

6. ซัยเมทิดีน

นำยาฉีดซัยเมทิดีน (MW 252.3, 100 มก./มล.) มา 0.1 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 3 มล. ได้สารละลายซัยเมทิดีนที่มีความเข้มข้น 5.28×10^{-6} M

7. โดปามีน

ชั่งโดปามีนไฮโดรคลอไรด์ (MW 189.7) 474.25 มก. ละลายในสารละลายกรดแอสคอร์บิก (10 มก.%) จำนวน 10 มล. ได้สารละลายโดปามีนที่มีความเข้มข้น 10^{-3} M และทำการเจือจางด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก (1 มก.%) ให้ได้สารละลายโดปามีนที่มีความเข้มข้น $5 \times 10^{-4} - 10^{-11}$ M

8. โดรเพอริดอล

นำยาฉีดโดรเพอริดอล (MW 379.4, 5 มก./2 มล.) 2 มล. มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 มล. ได้สารละลายของโดรเพอริดอลที่มีความเข้มข้น 1.05×10^{-6} M

9. ฮาโลเพอริดอล

ละลายฮาโลเพอริดอล (MW 375.9) 46.9875 มก. ในเอธานอล 95% 1 มล. และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มล. ได้สารละลายฮาโลเพอริดอลที่มีความเข้มข้น 5×10^{-5} M แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายฮาโลเพอริดอลที่มีความเข้มข้น 5×10^{-6} M

10. ฮีสตามีน

ละลายเกลือฮีสตามีนไดฟอสเฟต (MW 307.1) 767.75 มก. ด้วยน้ำกลั่น 10 มล. ได้สารละลายฮีสตามีนที่มีความเข้มข้น 10^{-3} M ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายฮีสตามีนที่มีความเข้มข้น $5 \times 10^{-4} - 10^{-7}$ M

11. ไฮดราลาซีน

ชั่งไฮดราลาซีน (MW 196.6) 24.575 มก. ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. ได้สารละลายไฮดราลาซีนที่มีความเข้มข้น 5×10^{-5} M แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายไฮดราลาซีนที่มีความเข้มข้น $10^{-5} - 10^{-7}$ M

12. ไอโซโปรเทอรินอล

ชั่งไอโซโปรเทอรินอลไฮโดรคลอไรด์ (MW 361.3) 45.1625 มก. ละลายในสารละลายกรดแอสคอร์บิก (10 มก.%) 1 มล. ได้สารละลายไอโซโปรเทอรินอลที่มีความเข้มข้น 5×10^{-5} M แล้วทำการเจือจางด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก (1 มก.%) ให้ได้สารละลายไอโซโปรเทอรินอลที่มีความเข้มข้น $10^{-6} - 10^{-7}$ M

13. คีแทนเซริน

ชั่งคีแทนเซริน (MW 395.4) 40 มก. ละลายในสารละลายกรดแอสคอร์บิก (1 มก.%) 40 มล. ได้สารละลายคีแทนเซรินที่มีความเข้มข้น 1.01×10^{-4} M แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายคีแทนเซรินที่มีความเข้มข้น 1.01×10^{-6} M

14. นอร์อะดรีนาลีน

ชั่งนอร์อะดรีนาลีนไบตาร์เตรต (MW 319.3) 798.25 มก. ละลายในสารละลายกรดแอสคอร์บิก (10 มก.%) 10 มล. ได้สารละลายนอร์อะดรีนาลีนที่มีความเข้มข้น 10^{-3} M แล้วทำการเจือจางด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก (1 มก.%) ให้ได้สารละลายนอร์อะดรีนาลีนที่มีความเข้มข้น $5 \times 10^{-4} - 10^{-7}$ M

15. ปาปาเวอรีน

ชั่งปาปาเวอรีนไฮโดรคลอไรด์ (MW 375.8) 93.95 มก. ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. ได้สารละลายปาปาเวอรีนที่มีความเข้มข้น 10^{-4} M แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายปาปาเวอรีนที่มีความเข้มข้น $5 \times 10^{-5} - 10^{-7}$ M

16. โปแตสเซียมคลอไรด์

ชั่งโปแตสเซียมคลอไรด์ (MW 74.56) 5.592 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. ได้สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 30 mM

17. พราโซซิน

ละลายพราโซซินไฮโดรคลอไรด์ (MW 419.9) 10.4975 มก. ในน้ำกลั่น 1 มล. ได้สารละลายพราโซซินที่มีความเข้มข้น 10^{-5} M แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายพราโซซินที่มีความเข้มข้น 10^{-6} M

18. โปรปราโนลอล

ละลายโปรปราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ (MW 295.8) 36.975 มก. ในน้ำกลั่น 1 มล. ได้สารละลายโปรปราโนลอลที่มีความเข้มข้น 5×10^{-5} M แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายโปรปราโนลอลที่มีความเข้มข้น 5×10^{-6} M

19. ซีโรโทนิน

ชั่งซีโรโทนินครีเอทินินซัลเฟต (MW 387.4) 484.25 มก. ละลายในสารละลายกรดแอสคอร์บิก (10 มก.%) จำนวน 5 มล. ได้สารละลายซีโรโทนินที่มีความเข้มข้น 10^{-3} M แล้วทำการเจือจางด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก (1 มก.%) ให้ได้สารละลายซีโรโทนินที่มีความเข้มข้น $5 \times 10^{-4} - 10^{-7}$ M

20. เวราปามิล

นำยาฉีดเวราปามิลไฮโดรคลอไรด์ (MW 491.1, 5 มก./2 มล.) 2 มล. มาทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 4 มล. ได้สารละลายเวราปามิลที่มีความเข้มข้น 1.01×10^{-4} M แล้วทำการเจือจางให้ได้สารละลายเวราปามิลที่มีความเข้มข้น 1.01×10^{-6} M

<u>หมายเหตุ 1</u>:

1. เนื่องจากยาบางตัวที่ใช้ในการทดลอง เช่นนอร์อะดรีนาลีน โดปามีน ไอโซโปรเทอรินอล คีแทนเซริน และซีโรโทนิน สลายตัวได้ง่ายจากการเกิดปฏิกิริยา autooxidation ดังนั้นจึงจำเป็นต้องละลายสารเหล่านี้ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเพื่อลดปฏิกิริยา autooxidation ที่เกิดขึ้น

2. เนื่องจากฮาโลเพอริดอล ละลายในน้ำได้น้อยมาก จึงต้องละลายในเอธานอล 95% ก่อน แล้วจึงนำไปทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นของเอธานอลในสารละลายที่ใช้ ได้มีการนำไปทดสอบกับเนื้อเยื่อใน organ bath แล้วผลปรากฏว่า ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของชิ้นเนื้อเยื่อหลอดเลือด

3. ปริมาตรของสารละลายยาที่ใส่ลงใน organ bath มีปริมาตรอยู่ระหว่าง 0.5-1.5 มล.

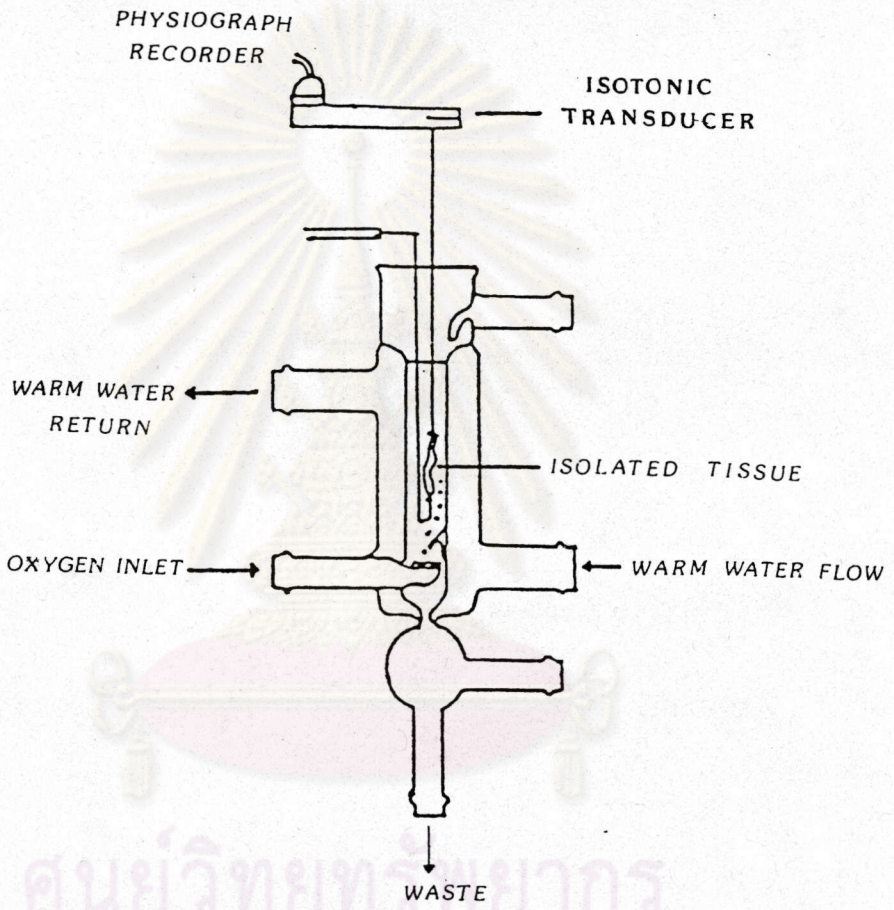
2.2.2 <u>การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อหลอดเลือด</u>

เก็บหลอดเลือดแดงของไตวัวจากโรงฆ่าสัตว์ กรุงเทพมหานคร ในสารละลาย modified Ringer solution ที่อิ่มตัวด้วย 100% O_2 และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C (ระยะเวลาที่รอเก็บหลอดเลือดหลังจากที่วัวถูกฆ่านานประมาณ 20-30 นาที) นำหลอดเลือดใส่ภาชนะแช่เย็นตลอดเวลาจนถึงห้องปฏิบัติการ โดยใช้เวลาเดินทางถึงห้องปฏิบัติการประมาณ 30-50 นาที ย้ายหลอดเลือดมาใส่ modified Ringer solution ที่ผ่าน 100% O_2 ตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเลาะเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกไปด้วยความระมัดระวัง หลอดเลือดที่เตรียมได้บางส่วนจะนำไปใช้ทำการทดลองทันที และบางส่วนจะนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อเก็บไว้ทำการทดลองต่อไป หลอดเลือดนี้จะเก็บไว้ได้ประมาณ 24 ชั่วโมง

ทำการตัดหลอดเลือดแบบ spiral โดยตัดทำมุม 45° กับ line ของหลอดเลือด แล้วตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม กว้าง-ยาว ประมาณ 6 x 12 มม. นำชิ้นหลอดเลือดนี้ไปผูกในลักษณะแนวดิ่งระหว่างตะขอใน organ bath ที่บรรจุสารละลาย modified Ringer solution ไว้ 25 มล. และมี 100% O_2 ผ่านตลอดเวลา (รูปที่ 2.1) ปลายด้านบนของชิ้นเนื้อเยื่อหลอดเลือดมัดติดกับตะขอของ Myograph F-60 isotonic tranducer ซึ่งต่อกับ 4-channel multipen recorder

ปล่อยให้เนื้อเยื่อมีการปรับตัวใน organ bath เป็นเวลา 45-60 นาที แล้วทำการปรับ resting tension ให้เท่ากับ 5 กรัม เพื่อให้เนื้อเยื่อทำงานได้เต็มที่ ในแต่ละการทดลองจำเป็นต้องปรับ resting tension ตามความเหมาะสม

ระหว่างปล่อยให้เนื้อเยื่อพักตัว ทำการเปลี่ยนน้ำยาใน organ bath ทุก ๆ 15-20 นาที ก่อนเริ่มต้นการทดลอง จะมีการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของชิ้นหลอดเลือดโดยการฉีดสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความ



รูปที่ 2.1 แสดงการวางชิ้นเนื้อเยื่อหลอดเลือดใน organ bath

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เข้มข้น 30 mM 0.1 มล. ลงไปใน organ bath หลอดเลือดจะมีการหดตัว หลังจากนั้นล้างน้ำยาหลาย ๆ ครั้ง และปล่อยให้เนื้อเยื่อพักตัวจนกระทั่ง resting tension กลับมาเท่าเดิมอีกครั้งหนึ่ง หา dose-response relationship ของสารที่เป็นสารกระตุ้นแต่ละชนิด โดยการให้ยาแบบสะสม (cumulative addition) ก่อนให้ยาใน dose ต่อ ๆ ไปต้องรอให้การตอบสนองของชิ้นหลอดเลือดต่อยาถึง steady state ก่อน ทำเช่นนี้ไปจนหลอดเลือดเกิดการตอบสนองสูงสุด

ในขณะเดียวกัน ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่ใช้เป็นสารกระตุ้น โดยนำหลอดเลือดบางส่วนมาขูดเยื่อบุผนังหลอดเลือดออกโดยวิธีการขูด (rubbing) (Cocks and Angus, 1983) ซึ่งทำโดยใช้สำลีพันปลายไม้ที่เปียกชุ่มด้วยสารละลาย modified Ringer แล้วค่อย ๆ ขูดเบา ๆ ก่อนเริ่มทำการทดลอง ทำการตรวจสอบว่าได้ทำการขูดเอาเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดออกจนหมด โดยการให้อะเซทิล์ลโคลีนที่มีความเข้มข้น 10^{-6} M ถ้าหากหลอดเลือดไม่มีการคลายตัวเกิดขึ้น แสดงว่าการขูดเยื่อบุผนังหลอดเลือดออกไปนี้ได้ผลดี นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยการนำตัวอย่างหลอดเลือดไปดองในน้ำยาขั้นต้น (primary fixation) ใน 2% buffered glutaraldehyde ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย buffer solution ชนิดเดียวกับที่ใช้เป็นตัวทำละลายในน้ำยาดอง เพื่อล้างน้ำยาดองขั้นต้นที่มากเกินพอออก ทำการล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านการล้างดังกล่าวแล้ว ไปผ่านการดองอีกครั้งในน้ำยาดองที่สอง (secondary fixation) หรือเรียกว่า post-fixation ด้วย 2% buffered osmium tetroxide เพื่อทำให้ตัวอย่างแข็งตัวมากยิ่งขึ้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างตัวอย่างด้วย buffer solution หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการกำจัดน้ำออกจนได้ตัวอย่างที่แห้งโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ผิวไปจากสภาพความเป็นจริง โดยเริ่มต้นจากการผ่านตัวอย่างใน ethyl alcohol ในความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นตามลำดับดังนี้ คือ 35%, 70%, 95%

และ 100% ขั้นต่อไปเป็นการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤติ (Critical point drying) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการขจัดน้ำออก (dehydration) ด้วย ethyl alcohol แล้วไปผ่านสารอินทรีย์เหลว (Freon 113) ซึ่งเป็น intermediate fluid หลังจากนั้นนำไปใส่ใน transitional fluid (CO_2 เหลว) ขั้นตอนสุดท้ายนี้ทำภายใน critical point drying bomb ซึ่งเป็นภาชนะพิเศษที่สามารถควบคุมความดันและอุณหภูมิได้ ของเหลวอินทรีย์ในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งได้เข้าไปแทนที่ของเหลวภายในตัวอย่างตามลำดับดังกล่าวจะกลายเป็นไอ ภายในระยะเวลาสั้นหลังจากเพิ่มความดันและอุณหภูมิให้ถึงจุดวิกฤตของ CO_2 เหลว ทำให้ตัวอย่างแห้งสนิทโดยจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงความตึงของผิวตัวอย่าง แล้วจึงนำตัวอย่างไปวางบน stub โดยใช้ conductive silver paint หลังจากนี้แล้วจึงนำตัวอย่างไปฉาบผิวด้วยโมเลกุลทองใน sputtering unit แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope (SEM), Model JSM-20) ได้ทันที จากรูปที่ 2.2 เป็นภาพถ่ายที่ได้จากการตรวจสอบพื้นผิวของหลอดเลือดด้วย SEM โดยใช้กำลังขยาย 1500 x ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการขูด (rubbing) ที่ใช้ในการขูดเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดออกไปนั้นเป็นวิธีการที่ใช้ได้ผลดี

2.2.3 <u>แผนการศึกษาทดลอง</u>

หลังจากปล่อยให้เนื้อเยื่อพักตัวแล้ว ทำการศึกษาทดลองชิ้นเนื้อเยื่อที่เตรียมเสร็จในหัวข้อ 2.2.2 เพื่อดูการตอบสนองต่อสารที่มีผลต่อหลอดเลือด (vasoactive agent) ต่าง ๆ โดยจะทำการศึกษาเป็นกลุ่ม ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารดังต่อไปนี้คือ โดปามีน ฮีสตามีน นอร์อะดรีนาลีน ซีโรโทนิน และแคลเซียมคลอไรด์ ทั้งที่มีสารต้านฤทธิ์และไม่มีสารต้านฤทธิ์ แผนการทดลองที่สรุปไว้ในตารางที่ 2.1

กลุ่มที่ 2 ศึกษาการตอบสนองหลอดเลือดต่อสารดังต่อไปนี้คือ อะเซทิย์ลโคลีน ไฮดราลาซีน ไอโซโปรเทอรินอล และปาปาเวอรีน ทำ

รูปที่ 2.2 ภาพพื้นผิวด้านในของชิ้นเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดงจากไตของวัวที่มีเยื่อบุผนังหลอดเลือด (ภาพบน) และไม่มีเยื่อบุผนังหลอดเลือด (ภาพล่าง) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอนแบบสแกน (กำลังขยาย x 1500)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 แสดงแผนการทดลองของการทดลองกลุ่มที่ 1 และ 2

กลุ่มที่	สารกระตุ้น (Agonist)		สารต้านฤทธิ์ (Antagonist)		หมายเหตุ
	สาร	ความเข้มข้น (M)	สาร	ความเข้มข้น (M)	
1	Dopamine	10^{-11}-10^{-2}	1) Droperidol	1.05×10^{-6}	DA_1-antagonist
			2) Haloperisol	5×10^{-6}	DA-antagonist
			3) Propranolol	5×10^{-6}	β-antagonist
	Histamine	10^{-7}-7.5×10^{-3}	1) Chlorpheniramine	1.02×10^{-6}	H_1-antagonist
			2) Cimetidine	5.28×10^{-6}	H_2-antagonist
	Noradrenaline	10^{-7}-2.5×10^{-3}	1) Prazosin	1×10^{-6}	α_1-antagonist
	Serotonin	10^{-7}-5×10^{-3}	1) Ketanserin	1.01×10^{-6}	5-HT_2-antagonist
	*$CaCl_2$	10^{-4}-5×10^{-2}	1) Verapamil	1.01×10^{-6}	Calcium channel blocker
2	Acetylcholine	10^{-7}-5×10^{-4}	1) Atropine	5×10^{-7}	muscarinic antagonist
	Hydralazine	10^{-7}-5×10^{-5}	1) Propranolol	5×10^{-6}	β-antagonist
	Isoproterenol	10^{-7}-5×10^{-5}	1) Haloperidol	5×10^{-6}	DA-antagonist
			2) Propranolol	5×10^{-6}	β-antagonist
	Papaverine	10^{-7}-10^{-4}			

* ทำการศึกษาใน Ca^{++}-free modified Ringer solution

การศึกษาผลของสารต้านฤทธิ์ด้วย ดังแผนการทดลองในตารางที่ 2.1 ในกลุ่มนี้ตอนท้ายการทดลองมีการให้ปาปาเวอรีนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-4} M เพื่อประเมินผลการคลายตัวของหลอดเลือดโดยกำหนดให้เป็นการคลายตัว 100%

หมายเหตุ 2:

1. ในการศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อหลอดเลือดที่มีเยื่อบุผนังหลอดเลือดและไม่มีเยื่อบุผนังหลอดเลือดนั้นทำการศึกษาในหลอดเลือดเดียวกันและทำการทดลองควบคู่กันไป

2. การใส่สารที่เป็นสารต้านฤทธิ์จะให้ก่อนที่จะเริ่มศึกษาผลของสารกระตุ้นเป็นเวลา 15-20 นาที

2.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด แสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย การวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยใช้ Student's paired t-test ทดสอบความแตกต่างของข้อมูล 2 กลุ่ม และใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way analysis of variance) ทดสอบถึงความแตกต่างของข้อมูลมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป ค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การคำนวณหาความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่ทำให้เกิด 50% response (EC_{50}) หาได้จากส่วนที่เป็นเส้นตรงของ concentration response curve โดยการวิเคราะห์แบบถดถอยเชิงเส้นตรง (Linear regression analysis)

ค่า Relative potency (pD_2) ของสารกระตุ้นหาได้จากสมการของ Van Rossum (1963) คือ

$$pD_2 = - \log A_{50}$$

เมื่อ A_{50} = ความเข้มข้นของสารกระตุ้นซึ่งให้ผลเท่ากับ 50% response (EC_{50})