บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และ สารทดลอง

1.1 สัตว์ทดลอง

ไก่เล็กฮอร์น (Leghorn) เพศผู้ อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 600-800 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย

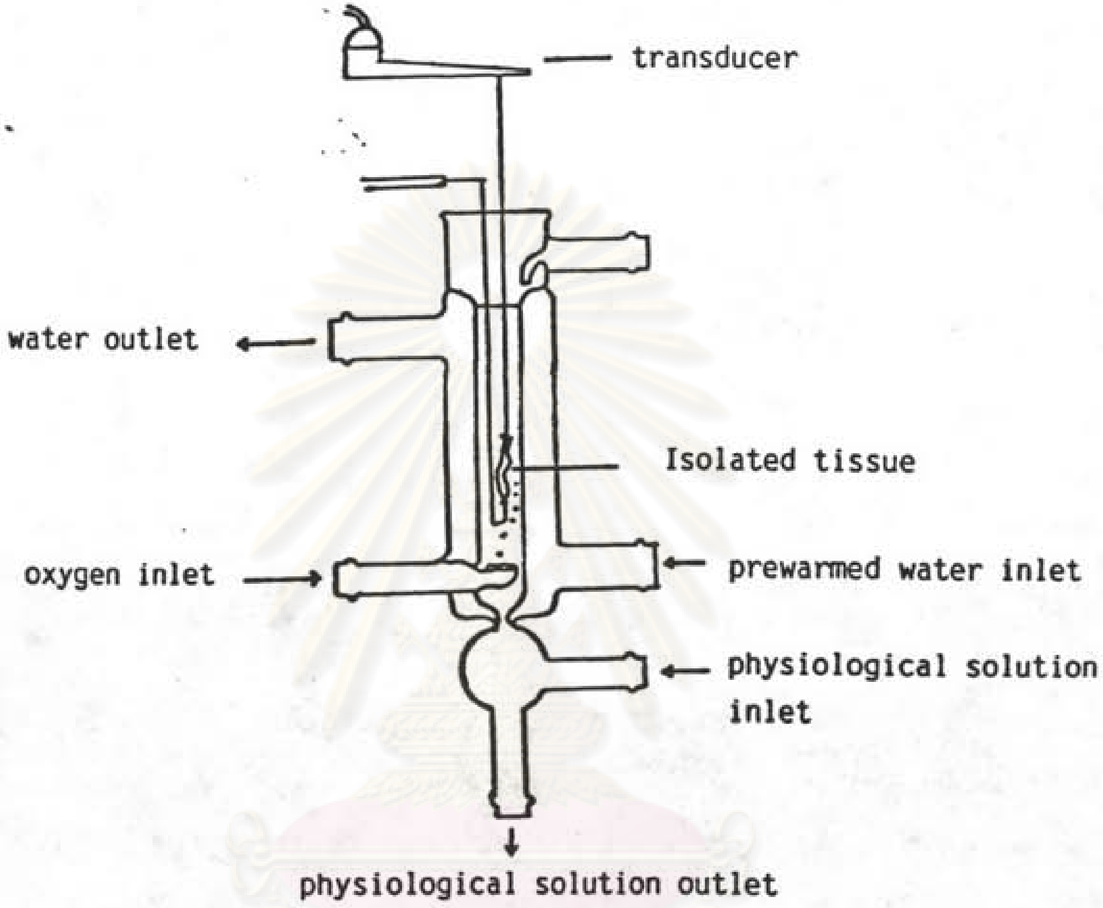
1.2 เครื่องมือ เครื่องมือที่ใช้มีดังนี้

1.2.1 Water jacketed organ bath ใช้แบบ double walled Churchill type ซึ่งประกอบด้วย หลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในมีความจุ 25 มิลลิลิตร เป็นชั้นที่บรรจุสารละลายที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ สำหรับการทดลองนี้ใช้ modified Krebs-Henseliet solution ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ตามที่ต้องการ (37 และ 45 องศาเซลเซียส) โดยจะมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำให้ไหลเข้า-ออกในชั้นนี้ water jacketed organ bath จะมีช่องเป็นทางเปิดให้อากาศ (ประกอบด้วยก๊าซออกซิเจน 95% และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%) ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นใน (รูปที่ 1)

1.2.2 Micropipette ขนาด 100 ไมโครลิตร

1.2.3 Isometric transducer (statham uc 3)

1.2.4 Dynograph type R (Beckman) สำหรับบันทึกผลการทดลอง



รูปที่ 1 Water jacketed organ bath

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 สารทดลอง

acetylcholine (sigma)

histamine (sigma)

potassium chloride (KCl)

isoprenaline (sigma)

theophylline (sigma)

verapamil (sigma)

indomethacin (sigma)

diphenhydramine (sigma)

propranolol (sigma)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

2.1.1 การเตรียมหลอดลม

ฉีด Pentobarbital Sodium 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโล - กรัมเข้าเส้นเลือดดำใต้ปีกไก่ ผ่าตัดกระดูกหน้าอกเพื่อเปิดช่องอกให้กว้างพอ ตัดเอาเนื้อเยื่อรอบ ๆ หลอดลมออกโดยไม่ทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมฉีกขาด ตัดเอาหลอดลม (primary bronchus) ทั้งสองข้างออกยาวประมาณข้างละ 1 เซนติเมตร นำมาแช่ในจานแก้วที่มี modified Krebs-Henseliet - solution (MKH) มีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งมีก๊าซออกซิเจน 95% และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลาที่ชิ้นเนื้อแช่อยู่

2.1.2 วิธีขูดเนื้อเยื่อบุผิว

ใช้ไม้พันสำลีถูเบา ๆ ภายในช่องของหลอดลม ข้างซ้ายหรือขวาสลับกันในไก่แต่ละตัวจนแน่ใจว่าเนื้อเยื่อบุผิวหลุดหมด ยืนยันผลการขูดเนื้อเยื่ออีกครั้งหนึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยนำหลอดลมไปตัด section หนาประมาณ 3-4 ไมครอนแล้วย้อมด้วย haematoxylin และ eosin แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ modified Kreb-Henseliet solution

สารเคมี	ความเข้มข้น (mM)
NaCl	113.0
KCl	4.8
$CaCl_2$	2.5
KH_2PO_4	1.2
$MgSO_4$	1.2
$NaHCO_3$	25.0
glucose	5.5

pH = 7.4

aerating gas 95% O_2 + CO_2 5%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3 การเตรียม Organ Bath

ตัดหลอดลมทั้งสองข้างเป็นรูป Zig-Zag ดังรูปที่ 2 (Emerson & Mackay, 1979) ผูกปลายทั้งสองข้างของหลอดลมแต่ละข้างให้แน่นด้วยด้าย นำปลายข้างหนึ่งผูกติดกับ water jacketed organ bath อีกข้างหนึ่งผูกติดกับ isometric transducers แล้วต่อกับ dynograph หลอดลมจะแช่อยู่ใน water jacketed organ bath ขนาด 25 มิลลิลิตรที่มี MKH และออกซิเจน 95%, คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านอยู่ตลอดเวลา ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 37 องศาเซลเซียส แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง โดยต้องเปลี่ยนน้ำสารละลาย MKH ทุก 15 นาทีก่อนการทดลอง

ขณะทดลองต้องปรับ transducers ให้ดึงชิ้นเนื้อด้วยน้ำหนัก 1 กรัมตลอดเวลา

2.2 การดำเนินการทดลอง

2.2.1 สารต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการศึกษาได้แก่

สารที่ใช้ทำให้หลอดลมหดตัว ได้แก่ acetylcholine, histamine

สารที่ใช้ทำให้หลอดลมคลายตัว ได้แก่ isoprenaline, theophylline และ KCl

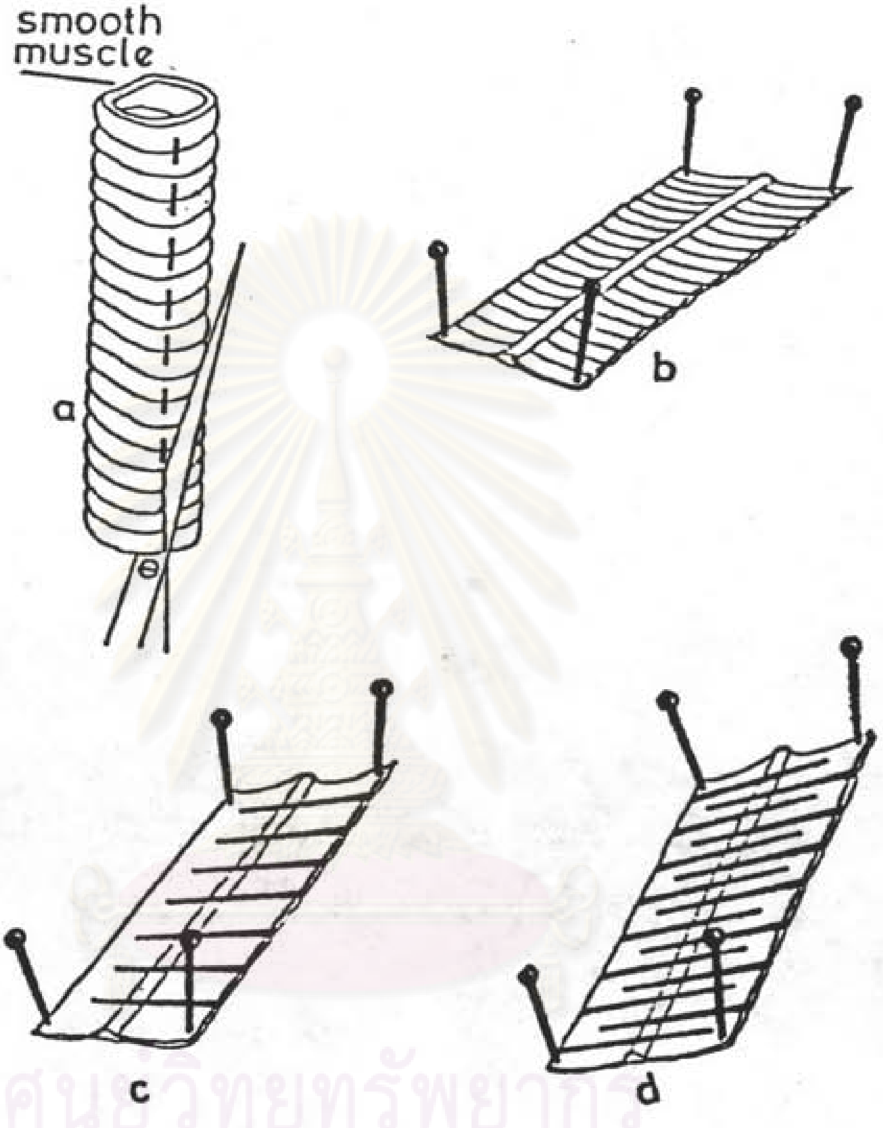
สารที่ใช้เป็น antagonist ได้แก่ verapamil, indomethacin, propranolol และ diphenhydramine

2.2.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

2.2.2.1 การศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยใช้ acetylcholine

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยใช้ acetylcholine ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการทำ cumulative dose-response curve ใช้เทคนิคของ Van Rossum (Van Rossum, Hurkmans & Wolters, 1963) ที่ทำให้ใน water jacketed organ bath มีความ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการตัดหลอดลมไก่ให้อยู่ในรูป zig zag

a = ตัดหลอดลมไก่ตามแนวเส้นประ

b = หลอดลมไก่ที่ตัดตามยาวแล้วนำมากางออก

c = ตัดด้านข้างตามแนวตัด

d = ตัดอีกข้างหนึ่งให้เยื้องกับข้างเดิม

เข้มข้นของ acetylcholine ตั้งแต่ 10^{-7} จนถึง 10^{-2}M เพื่อเป็นค่าควบคุม และเป็นการหาค่าความเข้มข้นของ acetylcholine ที่ทำให้เกิดการหดตัวสูงสุด ล้างเอา acetylcholine ออก 3-5 ครั้ง แช่ทิ้งไว้ในสารละลาย MKH 30 นาที

ต่อมาใส่ acetylcholine ที่มีความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการหดตัวสูงสุด ใส่สารอย่างใดอย่างหนึ่งใน 3 อย่าง ที่ใช้ในการทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวซึ่งได้แก่ isoprenaline, theophylline และ KCl ถ้าใช้ isoprenaline จะต้องทำให้สารใน water jacketed organ bath มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-9} จนถึง 10^{-5} M ถ้าใช้ theophylline จะต้องทำให้สารใน water jacketed organ bath มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-7} จนถึง 10^{-3} M หรือถ้าใส่ KCl จะต้องทำให้สารใน water jacketed organ bath มีความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mM ใช้สารใดสารหนึ่งเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ทำ cumulative dose-response curve ของสารนั้นโดยใช้เทคนิคของ Van Rossum เมื่อใส่สารที่ต้องการจนครบทุกความเข้มข้นแล้วล้างออก 3-5 ครั้ง แช่ทิ้งไว้นาน 30 นาที

ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียสจึงเริ่มจับเวลาหลังแช่ชิ้นเนื้อนั้นไว้นาน 30 นาที ทำการทดลองซ้ำเหมือนกับที่ใช้อุณหภูมิ 37 องศา - เซลเซียสเมื่อชิ้นเนื้อนั้นได้รับสารครบ 2 ชนิดแล้วจึงนำชิ้นเนื้อนั้นไปทดสอบทางวิทยาฮิสโตเพื่อยืนยันว่าได้ขูดเนื้อเยื่อบุผิวออกหมด ถ้าพบว่าชิ้นใดมีเนื้อเยื่อบุผิวอยู่ให้ตัดข้อมูลนั้นทิ้ง ทำเช่นนี้จนครบทุกสาร

2.2.2.2 การศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยให้สารที่ - เป็น antagonist ก่อนให้ acetylcholine

การหาค่าควบคุม (control) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ acetylcholine ทำ cumulative dose-response curve โดยใช้ -

เทคนิคของ Van Rossum ที่ทำให้ใน water jacketed organ bath มีความเข้มข้นของ acetylcholine ตั้งแต่ 10^{-7}M จนถึง 10^{-2}M ล้างออก 3-5 ครั้งแช่ทิ้งไว้ 30 นาที

ต่อมาใส่สารที่เป็น antagonist อย่างใดอย่างหนึ่งคือ indomethacin 10^{-5}M หรือ verapamil 10^{-6}M ก่อน 15 นาที แล้วจึงใส่ acetylcholine ทำ cumulative dose-response curve โดยใช้เทคนิคของ Van Rossum ที่ทำให้ใน water jecketed organ bath มีความเข้มข้นของ acetylcholine ตั้งแต่ 10^{-7}M จนถึง 10^{-2}M เมื่อใส่สารที่เป็น antagonist ตามต้องการครบทุกความเข้มข้นแล้วล้างออก 3-5 ครั้ง

ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียสจึงเริ่มจับเวลาหลังจากแช่ชิ้นเนื้อนั้นไว้นาน 30 นาที ทำการทดลองเหมือนดังที่ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งชิ้นเนื้อนั้นได้รับสารครบ 2 ชนิด จึงนำไปทดสอบทางวิทยาฮิสโตเพื่อยืนยันว่าได้ขูดเนื้อเยื่อบุผิวออกหมดถ้าพบว่าชิ้นใดยังมีเนื้อเยื่อบุผิวอยู่ให้ตัดข้อมูลนั้นทิ้ง ทำเช่นนี้ในสารที่เป็น antagonist ทั้ง 2 ชนิด

2.2.2.3. ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยใช้สาร histamine

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมไก่ โดยใช้ histamine ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำ cumulative dose-response curve โดยใช้เทคนิคของ Van Rossum ที่ทำให้ใน water jecketed organ bath มีความเข้มข้นของ histamine ตั้งแต่ 10^{-6}M จนถึง 10^{-2}M ล้างออก 3-5 ครั้งแช่ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อเป็นค่าควบคุม

ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียสจึงเริ่มจับเวลาหลังจากแช่ชิ้นเนื้อนั้นไว้นาน 30 นาที ทำการทดลองเหมือนดังที่ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปทดสอบทางวิทยาฮิสโตเพื่อยืนยันว่าได้ขูดเนื้อเยื่อบุผิวออกหมดถ้าพบว่าชิ้นใดยังมีเนื้อเยื่อบุผิวอยู่ให้ตัดข้อมูลนั้นทิ้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2.4 ศึกษากลไกการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมไก่จากการให้ histamine

ศึกษากลไกการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมไก่จากการให้ - histamine โดยใช้ histamine ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำ cumulative dose-response cruve โดยใช้เทคนิคของ Van Rossum ที่ทำให้ใน water jacketed organ bath มีความเข้มข้นของ histamine ตั้งแต่ 10^{-6}M จนถึง 10^{-2}M ล้างออก 3-5 ครั้งแช่ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อเป็นค่าควบคุม ต่อจากนั้นใช้สารที่เป็น antagonists ได้แก่

propranolol

diphenhydramine

indomethacin

indomethacin ร่วมกับ diphenhydramine

ใช้สารทีละชนิดโดยทำให้ใน water jacketed organ bath มีความเข้มข้นของสารนั้น ๆ เป็น 10^{-5}M ก่อนที่จะทำ cumulative dose-response curve โดยใช้เทคนิคของ Van Rossum ที่ทำให้ใน water jacketed organ bath มีความเข้มข้นของ histamine ตั้งแต่ 10^{-6}M จนถึง 10^{-2}M เมื่อชิ้นเนื้อได้ถูกทำการทดลองจนได้รับสารครบ 2 ชนิดแล้ว (histamine และ antagonist อย่างใดอย่างหนึ่ง) จึงนำไปทดสอบทางวิทยาฮิสโตเพื่อยืนยันว่าได้ขูดเนื้อเยื่อบุผิวออกหมดถ้าพบว่าชิ้นใดยังมีเนื้อเยื่อบุผิวอยู่ให้ตัดข้อมูลนั้นทิ้ง ทำเช่นนี้ในสารที่เป็น antagonists จนครบตามต้องการ

2.3 การศึกษาทางวิทยาฮิสโต

เพื่อเป็นการยืนยันว่าขูดเนื้อเยื่อบุผิวออกหมดหรือไม่ จึงนำชิ้นเนื้อที่ทำการทดลองเรียบร้อยแล้วไปย้อม haematoxylin และ eosin นำไปศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์ถ้าพบว่าชิ้นเนื้อชิ้นใดยังคงมีเนื้อเยื่อบุผิวอยู่ให้ตัดข้อมูลการทดลองของชิ้นเนื้อชิ้นนั้นทิ้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การประเมินผลการทดลอง

สำหรับชิ้นเนื้อที่ใช้ acetylcholine ในการทดลอง จะบันทึกการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมไก่ ภายหลังจากที่ได้รับ acetylcholine หรือสารที่ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม หรือ acetylcholine ภายหลังจากการให้สารที่เป็น antagonist แต่ละชนิด แต่ละความเข้มข้นแล้วนำไปคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการหดตัวสูงสุดของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมไก่ที่มีเนื้อเยื่อบุผิว ที่ได้จากการให้ acetylcholine 10^{-2} M ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ซึ่งคิดเป็น 100เปอร์เซ็นต์ ของไก่ตัวนั้น) นำผลที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวและคลายตัวของไก่แต่ละตัวที่ได้รับสารชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นเท่ากันไปหาค่า mean ± SE และใช้ student t-test หาค่าความแตกต่างทางสถิติ

สำหรับชิ้นเนื้อที่ได้รับ histamine จะบันทึกค่าการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมไก่เป็นมิลลิกรัม นำผลที่ได้จากการหดและคลายตัวของไก่แต่ละตัวที่ได้รับสารชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นเท่ากันไปหาค่า mean ± SE และใช้ student t-test หาค่าความแตกต่างทางสถิติ

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

4.1 ใช้ค่า mean และ standard error (SE) ในการวิเคราะห์การหดตัวหรือคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมไก่ที่ได้รับสารชนิดเดียวกันมีความเข้มข้นเท่ากัน

4.2 ใช้ student's t-test โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างหลอดลมไก่ที่มีและไม่มีเนื้อเยื่อบุผิว ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ เมื่อให้สารต่าง ๆ หรือเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิไป โดยค่า P จะต้องน้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ