บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ

1. Isolated Chamber
2. Isometric force displacement transducer (Grass FT 03 C)
3. Sekonic recorder ต่อกับ Harvard Transducer Amplifier
4. Churchill thermoregulator water pump
5. ถังแก๊ส O_2 95%, CO_2 5%
6. เครื่องมือผ่าตัด

สัตว์ทดลอง

หนูขาว (Wistar Rat) เพศผู้ น้ำหนักเฉลี่ย 200-250 กรัม จำนวน 80 ตัว

ยาและเคมีภัณฑ์

1. Barium Chloride ($BaCl_2 . 2H_2O$) (May & Baker)
2. 5-Hydroxytryptamine creatinine sulphate (5-HT) Sigma
3. Noradrenaline hydrochloride (NA) (Sigma)
4. Potassium chloride (KCl) (BDH)
5. Caffeine (Sigma)

สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยา Krebs-Henseleit ได้แก่

1. NaCl
2. KCl
3. $CaCl_2$
4. $MgSO_4.7H_2O$
5. KH_2PO_4
6. $NaHCO_3$
7. glucose

สารเคมีที่ใช้เป็น analytical grade ทั้งหมด น้ำที่ใช้เตรียมสารละลาย คือ น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

การเตรียมท่อนำอสุจิที่แยกมาจากหนูขาว

ฆ่าหนูโดยวิธีดึงคอ เปิดหน้าท้องและดัน testis เข้าไปในช่องท้อง ตัดท่อนำอสุจิที่ส่วนเหนือ epididymis และจุดที่ต่อกับ urethra ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและหลอดเลือดรอบ ๆ ออกให้หมดแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ prostatic และ epididymal part (จะใช้ส่วนใดขึ้นกับชนิดของตัวกระตุ้น) แช่เนื้อเยื่อไว้ใน organ bath ที่มี Krebs-Henseleit มีส่วนประกอบเป็นกรัมต่อลิตร ดังนี้ NaCl 6.95, KCl 0.34, $CaCl_2$ 0.28, $MgSO_4$, $7H_2O$ 0.30 KH_2PO_4 0.16, $NaHCO_3$ 2.10 และ glucose 1.99 ให้มี O_2 95% และ CO_2 5% ผ่านตลอดการทดลอง ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ ด้วย thermoregulator water pump ปลายข้างหนึ่งของท่อนำอสุจิผูกไว้กับ glass rod ส่วนอีกข้างหนึ่งผูกติดกับ transducers

ก่อนให้ยาแต่ละชนิดจะ equilibrate เนื้อเยื่อไว้เป็นเวลา 60 นาที ในการทดลองปรับ transducers ให้ดึงชิ้นเนื้อให้มีแรงตึง (resting tension) 0.5 กรัมตลอดเวลา และระหว่าง equilibrate จะเปลี่ยนน้ำยา Krebs-Henseleit ทุก ๆ 15 นาที

Organ Bath

Organ bath ที่ใช้ในการทดลอง (รูปที่ 3) ประกอบด้วย 2 compartments inner chamber มีความจุประมาณ 20 มล. สำหรับแช่เนื้อเยื่ออยู่ในสารละลาย ส่วน outer jacket นั้นจะมีน้ำซึ่งอุณหภูมิ 37°ซ ไหลเวียนรอบ ๆ เพื่อควบคุมอุณหภูมิภายใน inner chamber ให้คงที่ตลอดเวลา ท่อที่ออกมาจาก solution reservoir จะผ่านเข้าไปในขดแก้วของ condenser tube ดังนั้นสารละลายก็จะอุ่นขึ้นมีอุณหภูมิตามต้องการก่อนจะเข้าไปใน organ bath สารละลายจะถูกปล่อยให้ flow ไปตามขดแก้วเข้าไปใน organ bath และถูกปล่อยออกทางท่อข้างใต้ chamber โดยมีสารละลายถูกปล่อยเข้าใหม่แทนที่นอกจากนี้ยังมีท่อให้ oxygen ผ่านเข้าไปใน inner chamber ด้วย

ปกติในการทดลองแต่ละครั้งจะใช้ 2 chamber พร้อมกัน

การศึกษาผลของคาเฟอีนต่อการหดตัวของท่อนำอสุจิ

1. กระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย KCl ความเข้มข้น $1x10^{-1}$ M. ส่วนของท่อนำอสุจิที่นำมาศึกษาคือ prostatic part เพราะให้ phasic contraction ที่ชัดเจนกว่า epididymal part (Hay และ Wadsworth, 1982a) เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย KCl จะให้การตอบสนองที่ประกอบด้วย phasic และ tonic contraction บันทึกผลการหดตัว จากนั้นล้างเนื้อเยื่อโดยวิธีเปลี่ยนน้ำยาทุก ๆ 15 นาที การทดสอบผลของคาเฟอีนจะ equilibrated เนื้อเยื่อไว้ใน Krebs-Henseleit ที่มีคาเฟอีน เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงให้ KCl บันทึกผลการหดตัวของท่อนำอสุจิ ความเข้มข้นของคาเฟอีนที่ใช้ คือ 1, 3, 6 และ 10 mM.

2. กระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย $BaCl_2$ ความเข้มข้น $2x10^{-3}$ M. ส่วนของท่อนำอสุจิที่นำมาศึกษาคือ prostatic part เพราะให้ rhythmic contraction ที่ชัดเจนกว่า epididymal part (Hay และ Wadsworth, 1983a) เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย $BaCl_2$ จะให้การตอบสนองที่ประกอบด้วย phasic และ rhythmic contraction แล้วทำการทดลองทั้งก่อนและหลังการทดสอบผลของคาเฟอีนเหมือนข้อ 1

3. กระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย NE ความเข้มข้น 3 x 10^{-5} M. ส่วนของท่อนำอสุจิที่นำมาศึกษาคือ epididymal part เพราะให้ phasic contraction ที่ชัดเจนกว่า prostatic part (Hay และ Wadsworth, 1982b) เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย NE จะให้การตอบสนองที่ประกอบด้วย phasic และ tonic contraction แล้วทำการทดลองทั้งก่อนและหลังการทดสอบผลของคาเฟอีนเหมือนข้อ 1

4. กระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย 5-HT ความเข้มข้น 1.3 x 10^{-4} M. ส่วนของท่อนำอสุจิที่นำมาศึกษา คือ epididymal part เพราะให้ phasic และ rhythmic contraction ที่ชัดเจนกว่า prostatic part (Hay และ Wadsworth, 1982b) เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย 5-HT จะให้การตอบสนองที่ประกอบด้วย phasic และ rhythmic contraction แล้วทำการทดลองทั้งก่อนและหลังการทดสอบผลของคาเฟอีนเหมือนข้อ 1

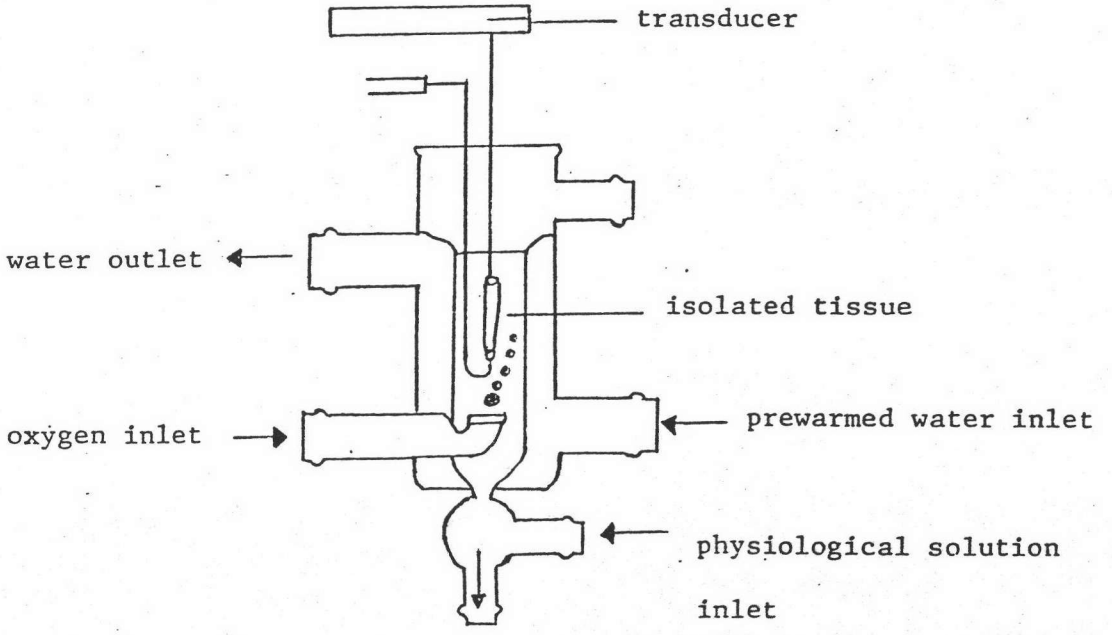
วิธีบันทึกข้อมูล

ก่อนการทดลองแต่ละครั้งจะ calibrated โดยใช้ตุ้มน้ำหนัก 1 กรัม แขวนที่ transducers แล้วดูว่า pointer ของ recorder เปลี่ยนแปลงไปกี่ซม. วิธีการบันทึกการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วยสารต่าง ๆ แสดงไว้ในรูปที่ 4

การประเมินผลการทดลอง

1. เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย KCl หรือ NE บันทึก phasic และ tonic contraction เปรียบเทียบความแตกต่างของ phasic และ tonic contraction ในกลุ่มที่ให้และไม่ให้คาเฟอีน

2. เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย $BaCl_2$ หรือ 5-HT บันทึก phasic และ rhythmic contraction เปรียบเทียบความแตกต่างของ phasic และ rhythmic contraction ระหว่างกลุ่มที่ให้และไม่ให้คาเฟอีน

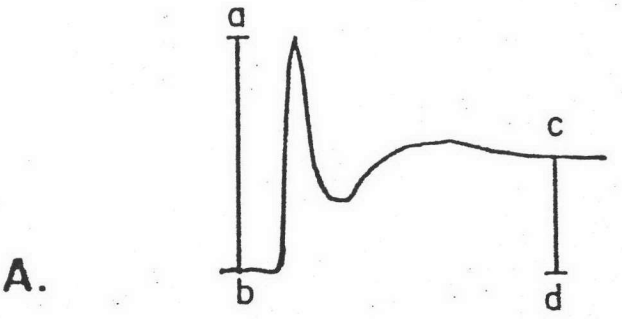


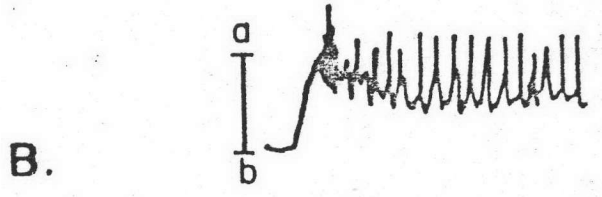
รูปที่ 3 ORGAN BATH

017437

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ใช้ student's paired t-test





รูปที่ 4 แสดงวิธีบันทึกการหดตัวของท่อนำอสุจิ โดย isometric transducer ระยะ ab คือ แอมปลิจูดของ phasic contraction ของ KCl (A) และ $BaCl_2$ (B) (มีหน่วยเป็นกรัม) ระยะระหว่าง c และ d คือ แอมปลิจูดของ tonic contraction (มีหน่วยเป็นกรัม) ความถี่ของ rhythmic contraction ตรวจวัดในเวลา 5 นาที หลังจากให้ยา และมีหน่วยเป็น นาที $^{-1}$