บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือและสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว เพศผู้ พันธุ์ Wistar น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

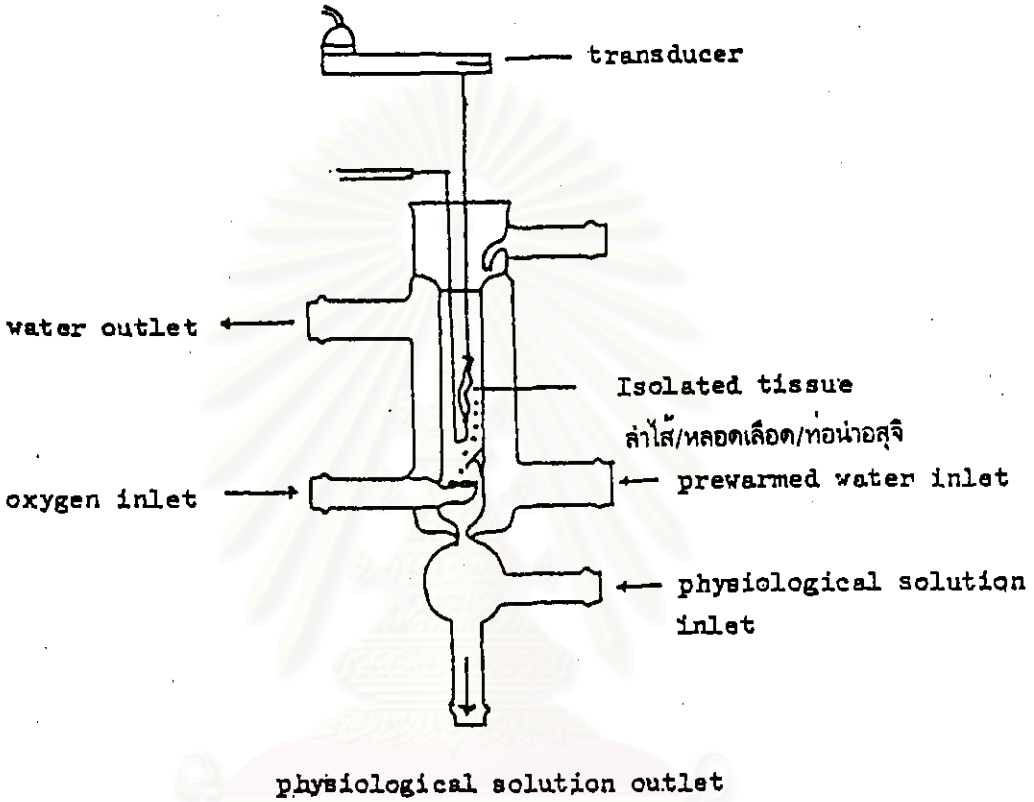
กระต่าย เพศผู้ พันธุ์ New Zealand น้ำหนักประมาณ 1.5-2.0 กิโลกรัม จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เครื่องมือ

- Organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วย ผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Physiological Solution) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกมาทดลอง และมีช่องเปิดให้ก๊าซ Carbogen (O_2 95% + CO_2 5%) ผ่านเข้าได้ ชั้นนอกของ Organ bath มีน้ำมาไหลเวียน ซึ่งควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส โดยมี thermoregulating water pump เป็นตัวส่งน้ำมาบริเวณดังกล่าว และทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ เพื่อควบคุมอุณหภูมิสารละลายใน chamber ด้านในให้คงที่ตลอดการทดลอง ดังในรูปที่ 5

- Water bath ชนิด Thermo bath model SCBI พร้อม thermoregulating water pump model 2E-Ny ของบริษัท Little giant pump

- Analog Digital Instrument (MacLab /4e™, AD instruments, Australia)



รูปที่ 5 organ bath แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Macintosh® Computer (Model LC 475, Apple Computer, Inc., U.S.A.) with Chart™ V 3.3.7 program for data recording system

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็นสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

acetylcholine hydrochloride	(Sigma)
serotonin creatinine sulfate	(Sigma)
noradrenaline	(Sigma)
histamine	(Sigma)
barium chloride	(May & Baker)
potassium chloride	(Sigma)

สารทดลอง

CU-763-10-01 เป็นสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์โดย ผศ.ดร.ชำนาญ ภัตรพานิช และคุณเฉลิมเกียรติ สงคราม โดยเตรียมในรูปสารละลายใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

Sodium valproate	(Sigma)
Pyridoxine hydrochloride	(Sigma)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบ

<u>การเตรียมลำไส้เล็ก (duodenum) กระต่าย</u>

เตรียมกระต่ายโดยอดอาหารก่อนการทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้แต่น้ำ ทำให้สลบโดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและหัว ผ่าท้องนำเอาลำไส้เล็ก ส่วน duodenum มาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Tyrode (ตารางที่ 2) อยู่ และมีก๊าซ Carbogen (O_2 95% + CO_2 5%) ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ใช้ syringe 10 มิลลิลิตรสำหรับล้างลำไส้ด้านในด้วยสารละลาย Tyrode ตัดแบ่งลำไส้เป็นท่อนยาว ประมาณ 1-2 เซนติเมตร ใช้

Physiological Solution	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	$NaHCO_3$	NaH_2PO_4	$MgSO_4$	KH_2PO_4	Glu-cose
Tyrode	8.0	0.2	0.2	0.1	1.0	0.05	-	-	1.0
Krebs Henseleit	6.92	0.35	0.28	-	2.09	-	0.14	0.16	2.1

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของสารชนิดต่าง ๆ ใน Physiological Solution ที่ใช้ในการทดลอง (กรัม/ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ด้าน โดยให้ปลายทั้งสองเปิดเพื่อให้สารละลาย Tyrode ผ่านได้ดังในรูปที่ 6 ผูกปลายด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ใน Organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 + 0.5 องศาเซลเซียส ที่บรรจุสารละลาย Tyrode ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีก๊าซ Carbogen ไหลผ่านตลอดการทดลอง ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับ Analog to Digital converter เครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง ปรับลำไส้ให้มีแรงตึงในขณะพัก 1 กรัม แล้ว incubate ประมาณ 30-60 นาที ในระหว่างการ incubate ลำไส้ เปลี่ยนสารละลาย Tyrode ทุก ๆ 15 นาที เมื่อลำไส้มีแรงตึงคงที่ จึงเริ่มทำการทดลอง

การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) กระต่าย

เตรียมกระต่ายซึ่งทำให้สลบโดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอ และหัว ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายหัวใจ ปอด (ส่วนที่บังหลอดเลือดแดงใหญ่) ออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่ที่กระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ในช่องอก ตัดหลอดเลือดแดงใหญ่มาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit (ตารางที่ 2) และมีก๊าซ Carbogen ผ่านตลอด ค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดออกจนหมด และตัดหลอดเลือดโดยตัดเป็นเกลียว (spiral) แล้วตัดแบ่งประมาณ 1-2 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ด้าน ผูกปลายด้านหนึ่งติดกับแท่งพลาสติก ดังในรูปที่ 7 แล้วนำไปแช่ใน Organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส ที่บรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit ปริมาตร 20มิลลิลิตร มีก๊าซ Carbogen ไหลผ่านตลอดการทดลอง ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อกับ Analog to digital converter เครื่องขยายสัญญาณ และเครื่องบันทึกผลการทดลอง ปรับหลอดเลือดให้มีแรงตึงในขณะพัก 1 กรัม แล้ว incubate ประมาณ 60-150 นาที ในระหว่างการ incubate หลอดเลือดเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก ๆ 15 นาที เมื่อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่ จึงเริ่มทำการทดลอง

การเตรียมกล้ามเนื้อท่อสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว

หนูขาวทำให้สลบโดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและหัว ผ่าตัดเปิดช่องท้อง ท่อสุจิจะอยู่ระหว่าง epididymis และ prostate gland ซึ่งจะพบท่อสุจิทั้ง 2 ข้าง ตัดท่อสุจิทั้งสองข้างออกมาแช่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit และมีก๊าซ Carbogen ผ่านตลอด ตัดแยกไขมันเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และหลอดเลือดออกให้หมด ใช้ syringe 1 มิลลิลิตร

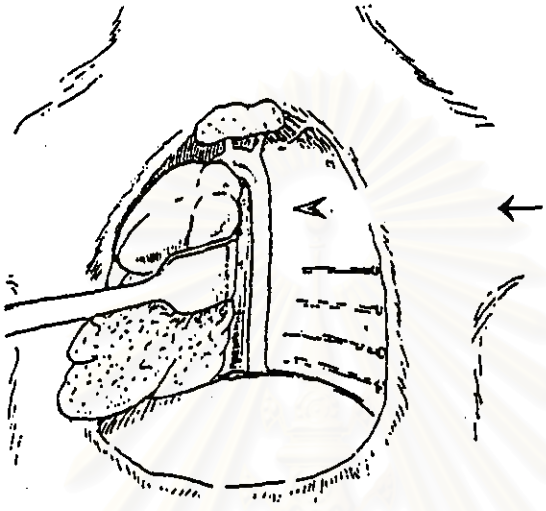
← ลำไส้เล็กส่วน Duodenum

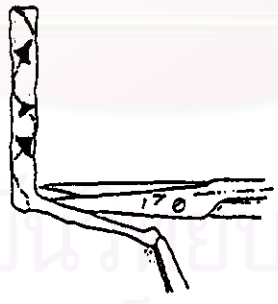
การล้าง Lumen

วิธีการผูกลำไส้เล็กส่วน Duodenum

รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งลำไส้เล็กส่วน duodenum และการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน Duodenum ของกระต่าย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





วิธีการตัดแบบเกลียว (Spiral)

รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่ (Thoracic aorta) และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของกระต่าย

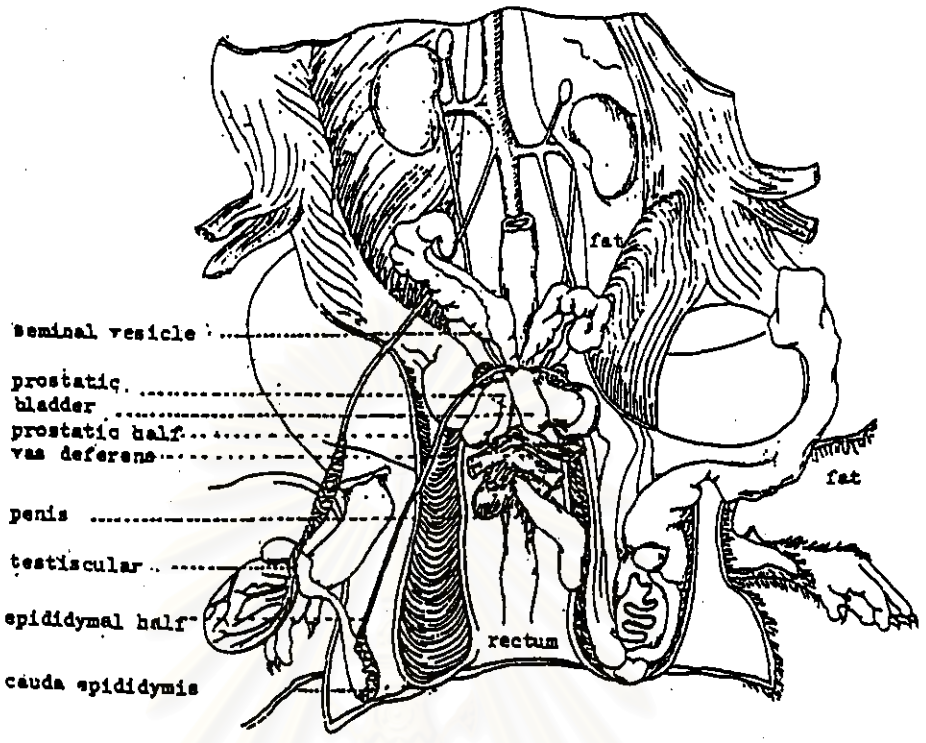
สำหรับล้างท่ออสุจิด้านในด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit ท่ออสุจิจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ prostatic halves และ epididymal halves ดังในรูปที่ 8

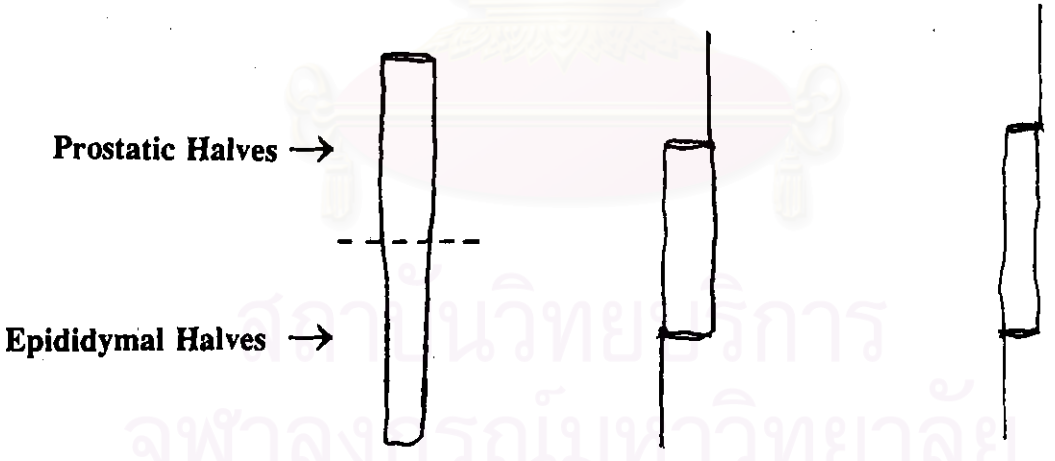
ในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ prostatic halves ของ vas deferens ศึกษาผลที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย potassium chloride และ barium chloride เพราะเป็นส่วนที่มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมได้อย่างชัดเจน (Hay และ Wadsworth, 1984) ส่วนบริเวณ epididymal halves ตอบสนองการกระตุ้นด้วย noradrenaline อย่างชัดเจนและดีกว่า prostatic halves (Hay และ Wadsworth, 1983) ดังนั้น การวิจัยที่กระตุ้นด้วย noradrenaline จึงเลือกใช้ส่วน epididymal halves เมื่อเลือกส่วนของท่ออสุจิที่ต้องการวิจัยแล้ว ตัดแบ่งประมาณ 1-2 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ด้าน โดยให้ปลายทั้งสองด้านเปิด เพื่อให้สารละลาย Krebs-Henseleit ผ่านได้ ผูกปลายด้านหนึ่งติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ใน Organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 37 + 0.5 องศาเซลเซียส ที่บรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีก๊าซ Carbogen ไหลผ่านตลอดการทดลอง ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับ Analog to digital converter เครื่องขยายสัญญาณ และเครื่องบันทึกผลการทดลอง ปรับท่ออสุจิให้มีแรงตึงในขณะพัก 1 กรัม แล้ว incubate ประมาณ 30-60 นาที ในระหว่างการ incubate ท่ออสุจิเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก ๆ 15 นาที เมื่อท่ออสุจิมีแรงตึงคงที่ จึงเริ่มทำการทดลอง

2. ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว

2.1 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum ของกระต่ายที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction)

incubate กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน duodenum เมื่อลำไส้เล็กมีการหดตัวสม่ำเสมอ บันทึกผลการหดตัว แล้วจึงให้ CU-763-10-01 ขนาด 4.4×10^{-6} M บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีกประมาณ 5 นาที ให้ CU-763-10-01 ขนาด 4.4×10^{-5} M บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีก 5 นาที เปรียบเทียบผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน duodenum ก่อนและหลังการให้ CU-763-10-01





ส่วน Prostatic Halves ส่วน Epididymal Halves

รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งท่อสุจิ (Vas deferens) และการผูกท่อสุจิหนูขาว

2.2 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum ของกระต่าย เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย Ach $1x10^{-7}$ M และ 5HT $1x10^{-6}$ M

incubate กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum เมื่อลำไส้เล็กมีการหดตัวสม่ำเสมอแล้ว จึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน duodenum บันทึกผลการหดตัวประมาณ 10 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นการหดตัวอีกครั้ง บันทึกผลการหดตัว แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้ง จนแรงตึงคงที่ เท่ากับก่อนได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว จากนั้นจึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวขนาดเท่าเดิมบันทึกผลการหดตัวของลำไส้เล็ก 5 นาที แล้วจึงให้ CU-763-10-01 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีกประมาณ 5 นาที แล้วให้สารกระตุ้นการหดตัวขนาดเท่าเดิม ใส่ลงใน Organ bath อีกครั้ง บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีกประมาณ 5 นาทีเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังให้ CU-763-10-01

2.3 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum ของกระต่าย เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย KCl 50 mM และ $BaCl_2$ 1 mM

incubate กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum เมื่อลำไส้มีการหดตัวสม่ำเสมอแล้ว จึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน duodenum บันทึกผลการหดตัวเป็นกลุ่มควบคุม แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้ง จนแรงตึงคงที่เท่ากับก่อนได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว จากนั้นจึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวบันทึกผลการหดตัวประมาณ 5 นาที หลังจากให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวแล้วจึงให้ CU-763-10-01 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M บันทึกผลการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน duodenum อีกประมาณ 10 นาที เป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

2.4 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย NE $1x10^{-6}$ M, 5HT $1x10^{-6}$ M และ KCl 50 mM

incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีแรงตึงคงที่กระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่ให้หดตัวโดยใช้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ บันทึกผลการหดตัวของ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กล้ามเนื้อหลอดเลือดเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3-5 ครั้ง แล้ว incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดนานประมาณ 60-120 นาที (ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่เท่ากับเมื่อเริ่มการทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยให้ CU-763-10-01 ก่อน 15 นาทีจึงให้สารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดในขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

2.5 ศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย NE $1x10^{-6}$ M, KCl 50 mM และ $BaCl_2$ 1 mM

เมื่อ incubate ท่ออสุจิจนมีแรงตึงคงที่แล้ว กระตุ้นท่ออสุจิให้หดตัว โดยใช้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ บันทึกผลการหดตัวของท่ออสุจิเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้น ล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3-5 ครั้ง แล้ว incubate ท่ออสุจิประมาณ 30-60 นาที (ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 10 นาที) จนกระทั่งท่ออสุจิมีแรงตึงคงที่เท่ากับเมื่อเริ่มการทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ CU-763-10-01 โดยให้ CU-763-10-01 ก่อน 15 นาที จึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิในขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

3. ศึกษาผลของ Sodium valproate (S.V.) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว

3.1 ศึกษาผลของ S.V. ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum ของกระต่าย เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย KCl 50 m M

incubate กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum เมื่อลำไส้เล็กมีการหดตัวสม่ำเสมอแล้ว จึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน duodenum บันทึกผลการหดตัวประมาณ 15 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้ง จนแรงตึงคงที่ เท่ากับก่อนได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว จากนั้นจึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวบันทึกผลการหดตัวประมาณ 5 นาทีหลังจากให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว แล้วจึงให้

S.V. ขนาด $4.4x10^{-5}$ M บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีกประมาณ 10 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังให้ S.V.

3.2 ศึกษาผลของ S.V. ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย เมื่อกระตุ้นโดย NE $1x10^{-6}$ M, 5HT $1x10^{-6}$ M และ KCl 50 mM

incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย ด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีแรงตึงคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่ให้หดตัว โดยใช้สารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือด บันทึกผลการหดตัวของหลอดเลือดเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3-5 ครั้ง แล้ว incubate หลอดเลือดนานประมาณ 60-120 นาที (ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Kreb-Henseleit ทุก 15 นาที) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่เท่ากับเมื่อเริ่มการทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ S.V. โดยให้ S.V. ก่อน 15 นาที จึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดในขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

3.3 ศึกษาผลของ S.V. ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ เมื่อกระตุ้นด้วย NE $1x10^{-6}$ M, KCl 50 mM และ $BaCl_2$ 1 mM

เมื่อ incubate ท่ออสุจิจนมีแรงตึงคงที่แล้ว กระตุ้นท่ออสุจิให้หดตัว โดยใช้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ บันทึกผลการหดตัวของท่ออสุจิเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้น ล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3-5 ครั้ง แล้ว incubate ท่ออสุจิประมาณ 30-60 นาที (ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Kreb-Henseleit ทุก 10 นาที) จนกระทั่งท่ออสุจิมีแรงตึงคงที่เท่ากับเมื่อเริ่มการทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ S.V. โดยให้ S.V. ก่อน 15 นาที จึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิในขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

4. ศึกษาผลของ B_6 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับการกระตุ้นโดยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว

4.1 ศึกษาผลของ B_6 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum ของกระต่าย เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย KCl 50 mM

incubate กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก ส่วน duodenum เมื่อลำไส้มีการหดตัวสม่ำเสมอแล้ว จึงให้สารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน duodenum บันทึกผลการหดตัวเป็นกลุ่มควบคุม แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้ง จนแรงตึงคงที่ เท่ากับก่อนได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว จึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวบันทึกผลการหดตัวประมาณ 5 นาที หลังจากให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว จากนั้นจึงให้ B_6 $4.4x10^{-5}$ M บันทึกผลการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน duodenum อีกประมาณ 10 นาที เป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

4.2 ศึกษาผลของ B_6 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายเมื่อกระตุ้นด้วย NE $1x10^{-6}$ M , 5HT $1x10^{-6}$ M และ KCl 50 mM

incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย ด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit จนกระทั่งหลอดเลือดแดงใหญ่มีแรงตึงคงที่กระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่ให้หดตัวโดยใช้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3-5 ครั้ง แล้ว incubate กล้ามเนื้อหลอดเลือดนานประมาณ 60-120 นาที (ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Kreb-Henseleit ทุกๆ 15 นาที) จนกระทั่งกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงคงที่เท่ากับเมื่อเริ่มการทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ B_6 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M โดยให้ B_6 ก่อน 15 นาที จึงให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดในขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดเป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

4.3 ศึกษาผลของ B_6 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย NE $1x10^{-6}$ M , KCl 50 mM และ $BaCl_2$ 1 mM

เมื่อ incubate ท่ออสุจิจนมีแรงตึงคงที่แล้ว กระตุ้นท่ออสุจิให้หดตัว โดยใช้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ บันทึกผลการหดตัวของท่ออสุจิเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้น ล้างออกด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit 3-5 ครั้ง แล้ว incubate ท่ออสุจิประมาณ 30-60 นาที (ในระหว่างนี้เปลี่ยนสารละลาย Kreb-Henseleit ทุก 10 นาที) จนกระทั่งท่ออสุจิมีแรงตึงคงที่เท่ากับเมื่อเริ่มการทดลอง จึงทำการศึกษาผลของ B_6 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M โดยให้ B_6 ก่อน 15 นาที จึงให้สารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิในขนาดเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิเป็นกลุ่มทดลองเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

การวัดผลและการนำเสนอผลการวิจัย

1. ลำไส้เล็ก (duodenum)

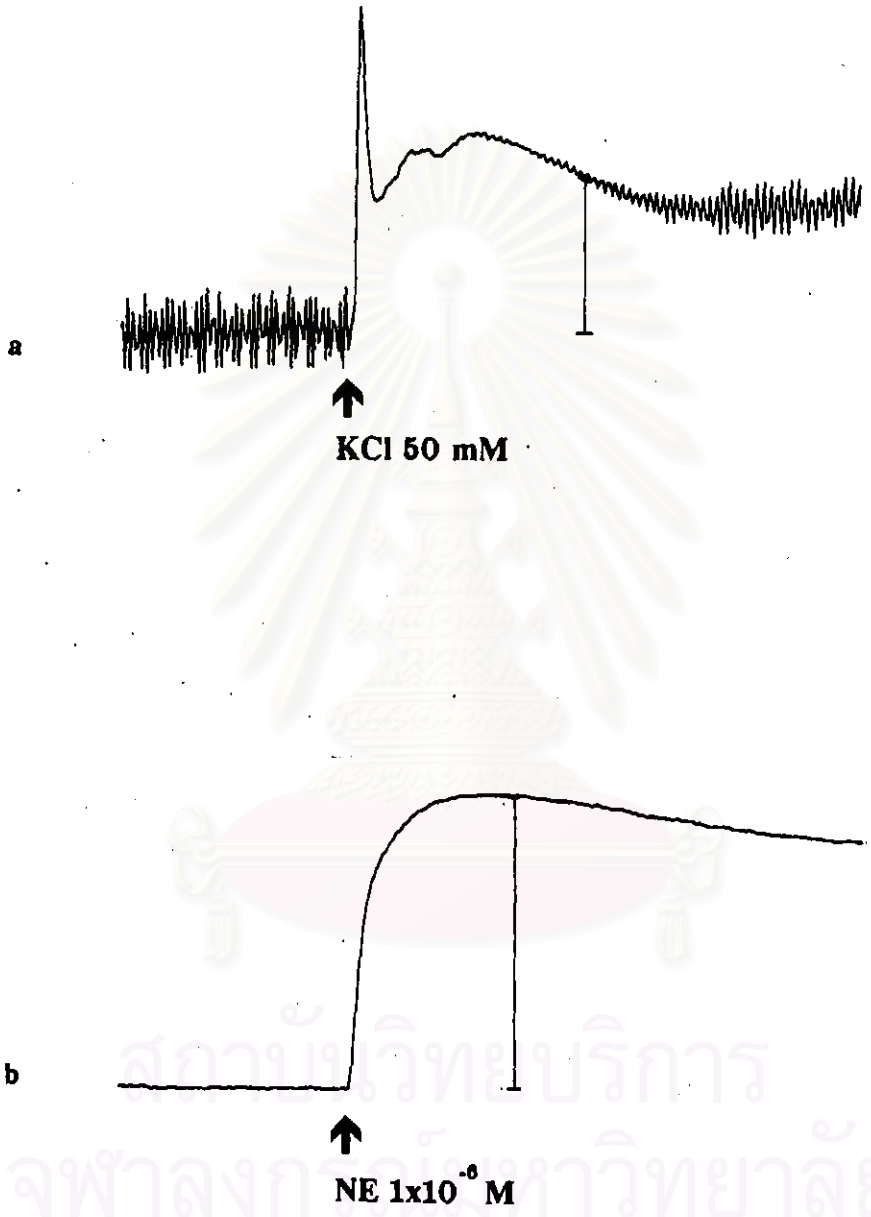
เมื่อกระตุ้นด้วย KCl 50 mM แรงในการหดตัวจะเพิ่มขึ้นทันที และลดลงอย่างช้าๆ (ดังในรูปที่ 9 a) วัดแรงในการหดตัวที่ 10 นาที และ 15 นาที

การนำเสนอผลการวิจัย จะนำเสนอเปรียบเทียบกับแรงในการหดตัวสูงสุด (maximum of contraction) วัดที่ 10 และ 15 นาที และนำเสนอผลการวิจัยในรูปร้อยละของแรงหดตัวที่ลดลงเฉลี่ย

2. หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta)

เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย NE $1x10^{-6}$ M , 5HT $1x10^{-6}$ M และ KCl 50 mM จะวัดแรงในการหดตัวที่ 5 min (ดังรูปที่ 9 b)

การนำเสนอผลการวิจัย จะนำเสนอเปรียบเทียบกับแรงในการหดตัวสูงสุด (maximum of contraction) และนำเสนอในรูปร้อยละของแรงหดตัวเฉลี่ย



รูปที่ 9 แสดงวิธีการวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

a. ลำไส้เล็กส่วน duodenum

b. หลอดเลือดแดง aorta

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ท่ออสุจิ (vas deferens)

3.1 เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย KCl

เมื่อกระตุ้นท่ออสุจิด้วย KCl ขนาด 50 mM ท่ออสุจิจะหดตัวโดยเกิด phasic contraction ขึ้นภายใน 30 วินาที หลังจากได้รับสารกระตุ้นตามด้วย tonic contraction (ดังในรูปที่ 10 a) ในการวัดผลการหดตัว จะเป็น 2 ลักษณะ

1. วัดแรงในการหดตัวสูงสุดใน phasic contraction
2. วัดแรงในการหดตัวใน tonic contraction ที่ 15 นาที และ 5 นาที หลังจากได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว

3.2 เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย $BaCl_2$ และ NE

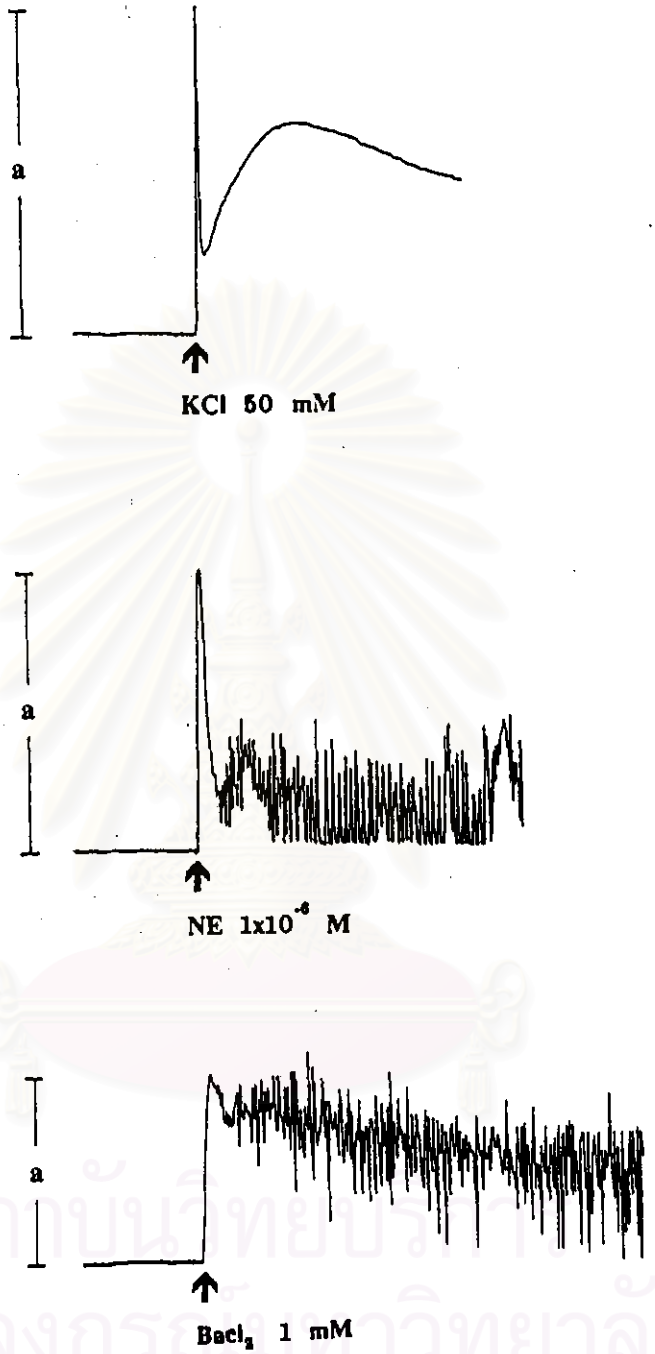
เมื่อกระตุ้นท่ออสุจิด้วย NE $1x10^{-6}$ M และ $BaCl_2$ 1mM ท่ออสุจิจะหดตัวโดยเกิด phasic contraction ตามด้วย rhythmic contraction (ดังในรูปที่ 11 b) ในการวัดผลการหดตัว จะเป็น 2 ลักษณะ

1. วัดแรงในการหดตัวสูงสุดใน phasic contraction
2. วัดค่าเฉลี่ยของความถี่ (mean frequency) ของ rhythmic contraction วัดในช่วงนาทีที่ 3 - 8 หลังจากได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว

การตอบสนองแบบ phasic, tonic และ rhythmic contraction จะนำเสนอผลการวิจัย เปรียบเทียบกับแรงในการหดตัวสูงสุด (maximum of contraction) และนำเสนอในรูปร้อยละของแรงในการหดตัว และร้อยละของความถี่ในการหดตัว ภายใน 5 นาที

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานเฉลี่ย (mean ± standard errors of the mean) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทำโดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมใช้ Student paired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)



รูปที่ 10 แสดงวิธีการวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ

a. คือ amplitude ในการหดตัวแบบ phasic

b. คือความแรงของในการหดตัวแบบ tonic

frequency ของการหดตัวแบบ rhythmic โดยวัดจำนวนครั้งใน การหดตัวของกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นตั้งแต่นาทีที่ 3 ถึงนาทีที่ 8