บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1.1 สัตว์ทดลอง

1.1.1 หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar เพศเมีย และเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 150-200 กรัม จากหน่วยงานสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมหนูขาว

- การเตรียมหนูขาวเพื่อศึกษากล้ามเนื้อเรียบมดลูก

เตรียมโดยฉีด estradiol valerate (Progynon Depot®) ขนาด 0.1 mg/kg. body weight ฉีดเข้าใต้ผิวหนังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทำการวิจัย เพื่อให้มดลูกอยู่ในช่วง estrus cycle ซึ่งเป็นระยะที่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกดี และมีความไว (sensitivity) ต่อการตอบสนองต่อ oxytocin

- การเตรียมหนูขาวเพื่อศึกษากล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่

หนูขาวที่จะนำมาศึกษากล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่นั้นไม่ต้องเตรียมไว้เหมือนกับการศึกษากล้ามเนื้อเรียบมดลูก การเตรียมนั้นใช้หนูขาวเพศใดก็ได้ซึ่งอยู่ในน้ำหนักที่ระบุไว้แล้วนำมาแยกหลอดเลือดแดงใหญ่ออกจากกาย

1.1.2 หนูตะเภาสีขาว เพศใดก็ได้ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม จากฟาร์มผู้เลี้ยง

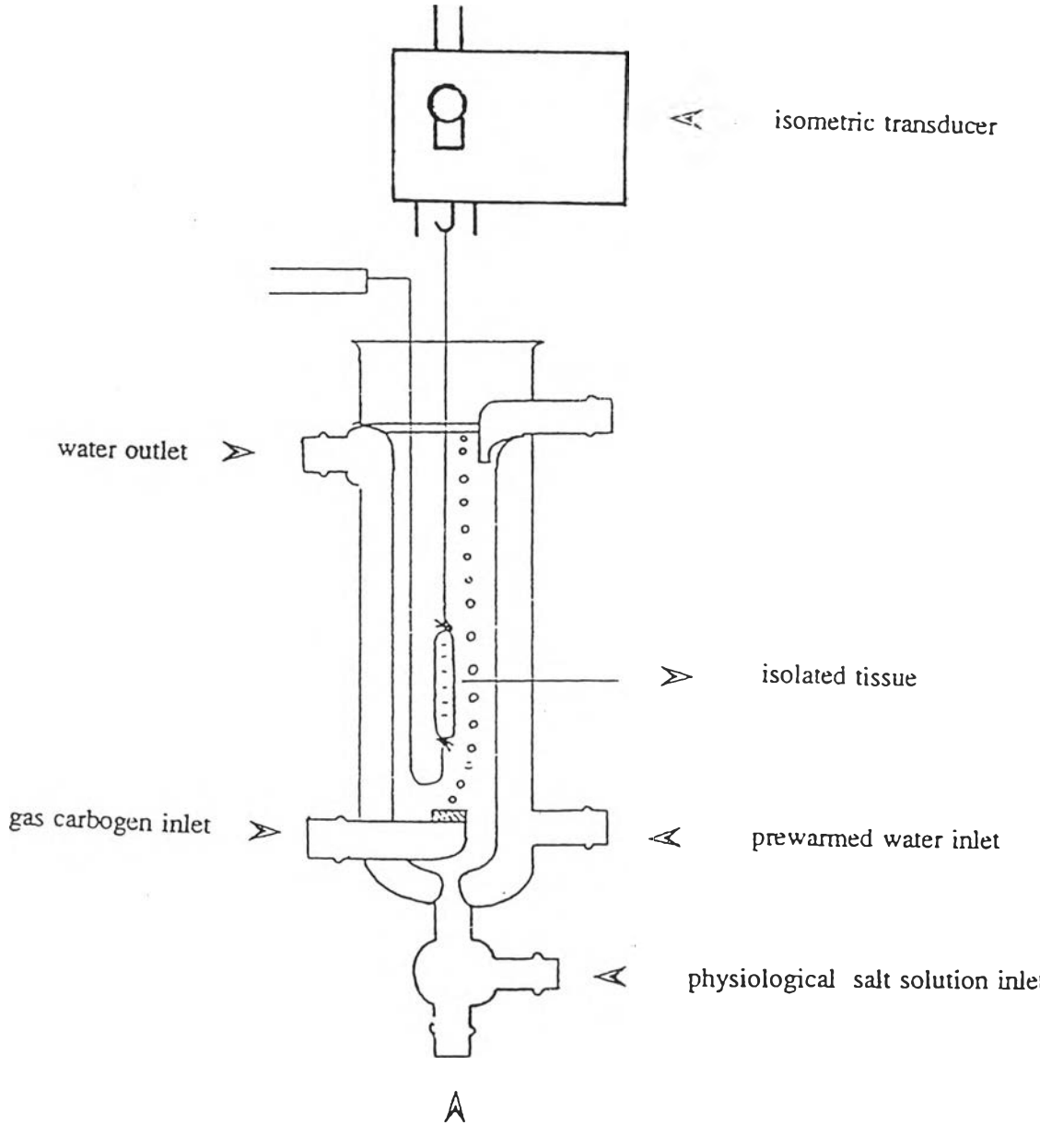
การเตรียมหนูตะเภา

ให้หนูตะเภาอดอาหารก่อนทำการวิจัย 24 ชั่วโมง ให้น้ำเพียงอย่างเดียว

1.2 เครื่องมือ

- organ bath แบบ double walled ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological salt solution) ขนาดบรรจุ 25 ml. จะมีช่องสำหรับการผ่านเข้าออกของก๊าซ carbogen ที่ใช้ในการทดลอง ($O_2$95%+$CO_2$5%) ชั้นนอกมีน้ำที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำจาก water bath ซึ่งจะ ควบคุมน้ำให้มีอุณหภูมิคงที่ (รูปภาพที่ 8)

- เครื่องมือวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (isometric transducer) ของบริษัท Nacro bio-system



รูปภาพที่ 8 แสดงชุดเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบต่าง ๆ ที่แยกจากกาย (isolated organ)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่แยกจากกาย (isolated organ)

- เครื่องมือบันทึกผลการวิจัย (recorder) ของบริษัท Nacro bio-system (Physiograph^{R})
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด
- evaporator (Rotavapor)
- ถังบรรจุก๊าซ carbogen ($O_2$95%+ $CO_2$5%) ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)

1.3 สารเคมี

1.3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

- oxytocin (syntocinon^{R}) ของบริษัท Sondoz, Switzerland
- acetycholine hydrochloride (ACh) ของบริษัท Sigma Chemical Co.,St. Louis, U.S.A.
- norepinephrine hydrochloride (NE) ของบริษัท Sigma Chemical Co., Louis, U.S.A.
- calcium chloride dihydrate ($CaCl_2$. $2H_2O$) (Fluka AG, Buchs, Switzerland.)
- 5-hydroxytryptamine (5-HT) ของบริษัท Sigma Chemical Co., Louis, U.S.A.
- histamine ของบริษัท Sigma Chemical Co., Louis, U.S.A.

1.3.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological salt solutions)

- sodium chloride, D(+)-glucose monohydrate, sodium hydrogen carbonate, calcium chloride dihydrate (E.merck. Darmstadt, Germany)
- potassium chloride, magnesium chloride hexahydrate (fluka AG, Buchs, Switzerland.)

1.3.3 สารเคมีที่ใช้เตรียมสัตว์ทดลอง

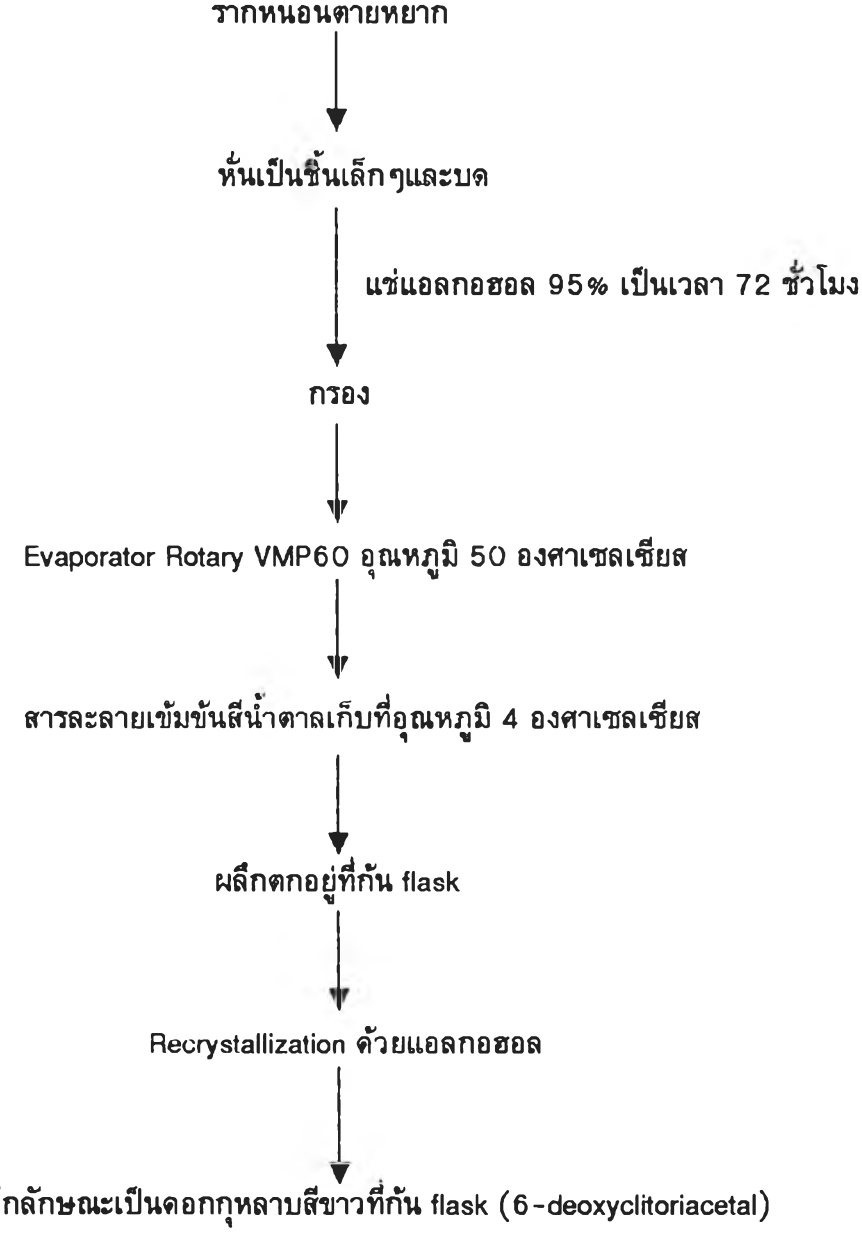
- estradiol valerate (Progynon Depot^{R}) ของบริษัท Shchering, Germany

1.3.4 สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดจากหนอนตายหยาก

- Dimethysulfoxide (DMSO)

1.4 สารสกัดรากหนอนตายหยาก (Clitoria macrophylla Wall. Cat.)

สกัดโดยแช่ใน 95 % alcohol เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองและนำไป evaported เอา alcohol ออกจะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเห็นผลึกตกอยู่ที่ก้น flask นำไป recrytallization ด้วยแอลกอฮอลจะเห็นผลึกลักษณะเป็นดอกกุหลาบสีขาวที่ก้น flask และนำผลึกมาใช้ในการวิจัย โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย(รูปภาพที่ 9)



รูปภาพที่ 9 แสดงการสกัด 6-deoxyclitoriacetal จากรากหนอนตายหยาก (Lin et al,1992)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว

1. เตรียม Locke's solution แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 32±0.5 °C

2. การเตรียมหนูขาวก่อนทดลอง 24 ชั่วโมง pretreatment ด้วย estradiol valerate ขนาด 0.1 mg/kg body weight ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เพื่อให้มดลูกอยู่ในระยะ estrus และทำให้ oxytocin receptor มีความไวต่อการตอบสนองเพิ่มขึ้น

3. นำหนูขาว มาตีศรีษะให้สลบ แล้วกระตุกข้อต่อที่คอให้กระดูกเลื่อนซึ่งจะทำให้หนูเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว (cervical dislocation)

4. เปิดหน้าท้องของหนูขาวจะเห็นมดลูกหนูขาว (uterine horn) ตัดมดลูกออกจากตัวหนูขาวทั้ง 2 ข้างแล้วนำไปใส่ใน petri dish ซึ่งมี Locke's solution และมี carbogen gas ผ่านตลอด

5. ค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันที่ติดอยู่ที่มดลูกออกให้หมด

6. ตัดมดลูกให้มีความยาว 1.5-2 เซนติเมตร จะได้หลอดมดลูก 4 ชิ้น ตัดหลอดมดลูกแต่ละชิ้นมาผ่าตามยาวของหลอดมดลูกจะได้เนื้อเยื่อ 2 ชิ้นต่อหลอดมดลูก 1 ชิ้น (รูปภาพที่ 10)

7. ใช้ด้ายผูกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อมดลูกที่ตัดเรียบร้อยแล้วนำไปยึดติดกับแผ่นพลาสติกที่ยึดติดกับ organ bath

8. Organ bath ชั้นในสุดมีความจุ 25 มิลลิลิตร บรรจุ Locke's solution อยู่และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา ส่วน organ bath ชั้นกลางจะมีน้ำอุณหภูมิ 32±0.5 °C ไหลผ่านตลอดเวลา

9. ปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อมดลูกที่ตัดเรียบร้อยแล้วจะผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งต่อกับ recorder

10. เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยตามขั้นตันแล้ว ปรับให้เนื้อเยื่อมีแรงตึง 0.5 กรัม ขณะที่ incubate อยู่นั้นเปลี่ยน Locke' s solution ทุกๆ 15 นาที

การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว

1. เตรียม Krebs-Henseliet Solution แล้วนำไป incubated ที่อุณหภูมิ 37±0.5 °C

2. นำหนูขาวมาเตรียมเอาหลอดเลือดแดงใหญ่โดยตีศรีษะให้สลบแล้วกระตุกข้อต่อที่คอให้กระดูกคอเลื่อนซึ่งจะทำให้หนูเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว (cervical dislocation)

3. เปิดหน้าอกหนูขาวจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่ที่กระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่ ใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ไปจนถึงหัวใจแล้วจึงตัดหลอด

เลือดแดงใหญ่ ซึ่งมีความยาวประมาณ 3 เซนติเมตร นำหลอดเลือดแดงใหญ่ไปวางไว้ใน petri dish ซึ่งมี Krebs-Henseliet solution และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา

4. ล้างเลือดที่ติดอยู่หลอดเลือดแดงใหญ่ แล้วค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันที่ติดอยู่ที่หลอดเลือดแดงใหญ่ออกให้หมด

5. ตัดหลอดเลือดแดงใหญ่แบบเกลียว (spiral) ให้มีความกว้างประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ยาว 2-2.5 เซนติเมตร ซึ่งจะได้หลอดเลือด 2 ชิ้น (รูปภาพที่ 11)

6. ให้ด้ายผูกด้านหนึ่งของหลอดเลือดที่ตัดเรียบร้อยแล้ว นำไปยึดติดกับแผ่นพลาสติกที่ยึดติดกับ organ bath

7. organ bath ชั้นในสุดมีความจุ 25 มิลลิลิตร บรรจุ Krebs-Henseliet solution อยู่และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา ส่วน organ bath ชั้นกลางจะมีน้ำอุณหภูมิ 37±0.5 °C ไหลผ่านตลอด

8. ปลายอีกด้านหนึ่งของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ติดเป็นรูปเกลียวผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งต่อกับ recorder

9. เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยตามขั้นตอนแล้วปรับเนื้อเยื่อมีแรงตึง 0.5 กรัม แล้วจึงเริ่มการทดลองขณะที่ incubate อยู่นั้นเปลี่ยน Krebs-Henseliet solution ทุก ๆ15 นาที

<u>การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา</u>

1. เตรียม Tyrode's solution แล้วนำไป incubate 37±0.5 °C

2. ให้หนูตะเภาอดอาหารก่อนการทดลอง 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความไวในการหดตัวของลำไส้และทำให้ลำไส้สะอาด

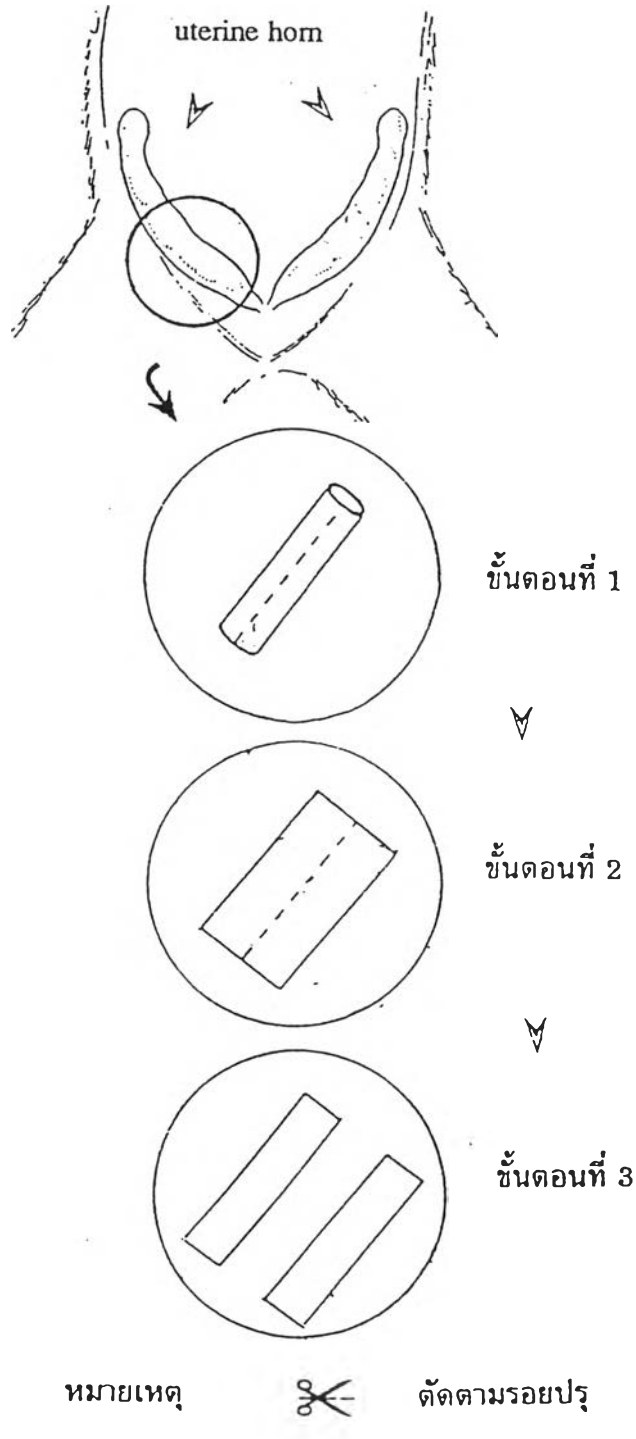
3. นำหนูตะเภามาเตรียมเอาลำไส้เล็กส่วน ileum โดยตีศีรษะให้สลบแล้วกระตุกข้อต่อที่คอให้กระดูกที่คอเลื่อนซึ่งจะทำให้หนูเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว (cervical dislocation)

4. เปิดหน้าอกของหนูตะเภา จะเห็นส่วน ileo-caecal junction แล้วตัดส่วน ileum ซึ่งจะตัดตั้งแต่เหนือ ieo-caecal junction ไปทางลำไส้เล็ก ตัดยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร นำลำไส้เล็กส่วน ileum ไปวางไว้ใน petri dish ซึ่งมี Tyrode's solution และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา

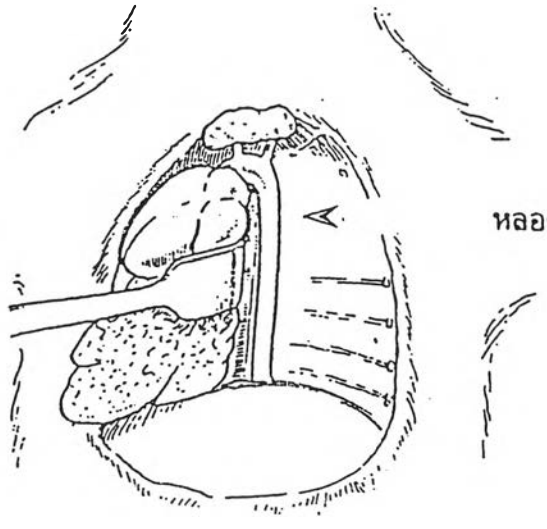
5. ค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันที่ติดอยู่ที่ลำไส้เล็กส่วน ileum ออกให้หมด ทำความสะอาด lumen โดยการใช้กระบอกฉีดยาฉีดเอา Tyrode's solution เข้า lumen หลาย ๆ ครั้ง (รูปภาพที่ 12)

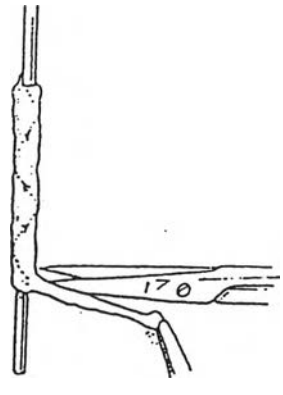
6. ตัดลำไส้เล็กส่วน ileum ออกเป็นชิ้น ซึ่งแต่ละชิ้นมีความยาว 1.5-2.0 เซนติเมตร

7. ใช้ด้ายผูกด้านหนึ่งของลำไส้เล็กส่วน ileum ที่ตัดเรียบร้อยแล้ว และนำไปยึดติดกับแผ่นพลาสติกที่ยึดติดกับ organ bath



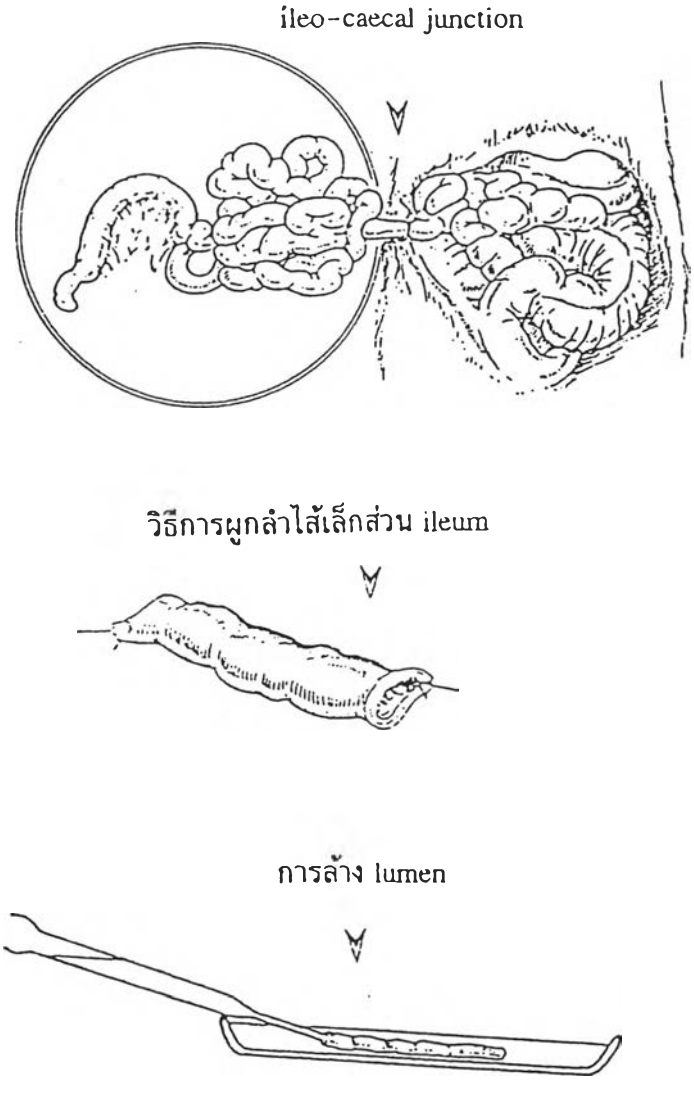
รูปภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งและลักษณะของมดลูก และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว (isolated rat uterus)





วิธีการตัดแบบเกลียว (spiral)

รูปภาพที่11 แสดงตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่ และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว (isolated rat aorta)



รูปภาพที่ 12 แสดงตำแหน่งลำไส้เล็กส่วน ileum และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน iluem ของหนูตะเภา (isolated guinea-pig ileum)

8. Organ bath ชั้นในสุดมีความจุ 25 มิลลิเมตร บรรจุ Tyrode's solution อยู่และมี carbogen gas ผ่านตลอดเวลา ส่วน organ bath ชั้นกลางจะมีน้ำอุณหภูมิ 34±0.5 °C ไหลผ่านตลอดเวลา

9. ปลายอีกด้านหนึ่งของลำไส้เล็กส่วน ileum ที่ตัดเรียบร้อยแล้วนั้น จะนำมาผูกติด isometric transducer ซึ่งต่อกับ recorder

10. เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยตามขั้นตอนแล้วปรับให้เนื้อเยื่อมีแรงตึง 0.5 กรัม incubate เนื้อเยื่อเป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเริ่มการทดลอง ขณะที่ incubate อยู่นั้นเปลี่ยน Tyrode's solution ทุก ๆ 15 นาที

<u>การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ตอนดังนี้</u>

<u>ตอนที่ 1</u> การศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาวที่แยกจากกาย ในสภาวะที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัวและเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine (ACh) , oxytocin

1.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ที่ใช้ในการละลาย 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของมดลูกหนูขาวที่แยกจากกาย ในสภาวะที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัวและเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) , oxytocin

1.2 ศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาวที่แยกจากกาย ในสภาวะที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัวและเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) , oxytocin

ตอนที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin(5-HT) , norepinephrine(NE) และ calcium chloride($CaCl_2$)ในสารละลาย potassium depolarizing

2.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ที่ใช้ในการละลาย 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดใหญ่ (aorta) ของหนูขาวที่แยกจากกายเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin(5-HT) , norepinephrine(NE) และ calcium chloride($CaCl_2$) ในสารละลาย potassium depolarizing

2.2 ศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin(5-HT) ,norepinephrine(NE) และ calcium chloride($CaCl_2$)ในสารละลาย potassium depolarizing

<u>ตอนที่ 3</u> การศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) , seroronin(5-HT) และ histamine

3.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ที่ใช้ในการละลาย 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine (ACh) , seroronin (5-HT) และ histamine

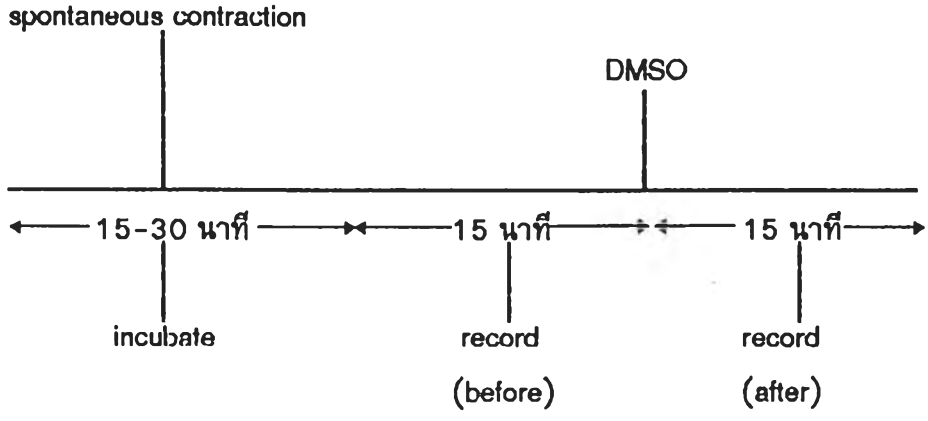
3.2 ศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นหดตัว acetylcholine(ACh) , seroronin(5-HT) และ histamine

<u>ตอนที่ 1</u> การศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาวที่แยกจากกาย ในสภาวะที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัวและเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) , oxytocin

1.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ใช้ในการละลาย 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของมดลูกของหนูขาวที่แยกจากกาย ในสภาวะที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัว และเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) , oxytocin

ในสภาวะที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น

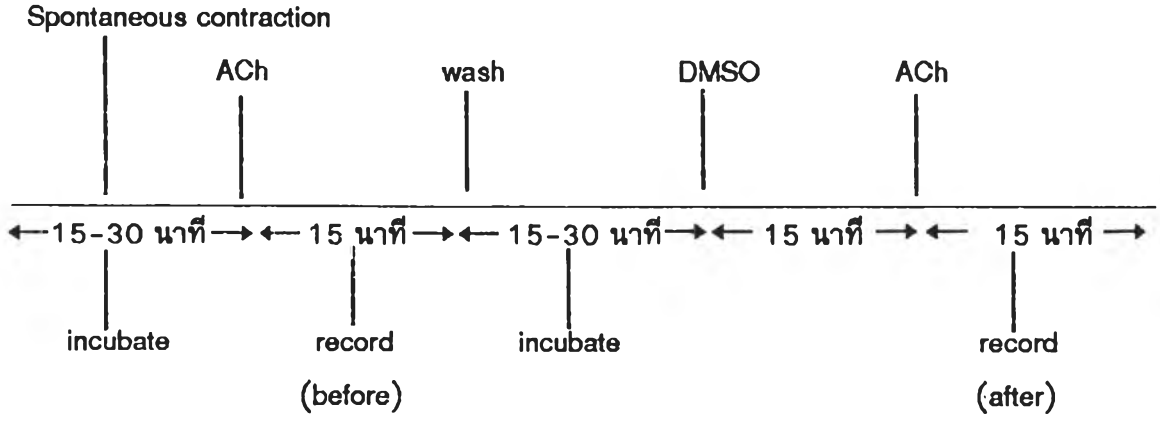
บันทึกการหดตัวของมดลูก 15 นาที แล้วจึงให้ตัวทำละลาย DMSO. ในปริมาตรเท่ากับ 6-deoxyclitoriacetal ที่ใช้ทดสอบ บันทึกผลการหดตัวต่อไปอีก 15 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังให้ DMSO(รูปภาพที่13)



(รูปภาพที่ 13)

<u>เมื่อได้รับสารกระตุ้นการหดตัว acetylcholine (ACh)</u>

ให้สาร acetylcholine(ACh)(5×10^{-6} M) กระตุ้นการหดตัวของมดลูกในขนาดทำให้มดลูกเกิดการหดตัว ได้ประมาณ 45-55% ของการหดตัวสูงสุด (submaximum dose) บันทึกผลการหดตัวของมดลูก 15 นาที แล้วล้างมดลูกด้วย Locke's solution หลาย ๆ ครั้ง incubate มดลูกประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยน Locke's solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้มดลูกพักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อไปโดยให้ตัวทำละลาย DMSO ในปริมาตรเท่ากับ 6-deoxyclitoriacetal ที่ใช้ทดสอบลงไปในมดลูก บันทึกผล 15 นาที แล้ว ให้สาร acetylcholine(ACh) อีกครั้งหนึ่งในขนาดเท่าเดิม เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังให้ DMSO (รูปภาพที่ 14)



(รูปภาพที่ 14)

เมื่อได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว oxytocin

ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับการศึกษาผลของตัวทำลาย DMSO เมื่อได้รับสารกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) (รูปภาพที่ 14) แต่เปลี่ยนสารกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) เป็น oxytocin (5×10^{-3} IU/ml)

1.2 ศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของในสภาวะที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัวและเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) , oxytocin

ในสภาวะที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัว

ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับการศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ในสภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้นการหดตัวของมดลูก (รูปภาพที่ 13) แต่เปลี่ยนจากการให้ตัวทำละลาย DMSO เป็น 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 0.2 mg/ml (5.35×10^{-4} M)

ในสภาวะที่ได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวacetylcholine (ACh)

ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับการศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ในสภาวะที่มีสารกระตุ้นการหดตัวของมดลูก acetylcholine (ACh) (5×10^{-6} M) (รูปภาพที่ 14) แต่เปลี่ยนจากการให้ตัวทำละลาย DMSO เป็น 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 0.2 mg/ml (5.35×10^{-4} M)

ในสภาวะที่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัว oxytocin

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ในสภาวะที่มีสารกระตุ้นการหดตัวของมดลูก acetylcholine(ACh) (รูปภาพที่ 14) แต่เปลี่ยนจากการให้สารมาตรฐานกระตุ้นหดตัว acetylcholine(ACh) เป็น oxytocin (5×10^{-3} IU/ml) และเปลี่ยนจากการให้ตัวทำละลาย DMSOเป็น 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 0.2 mg/ml (5.35×10^{-4} M)

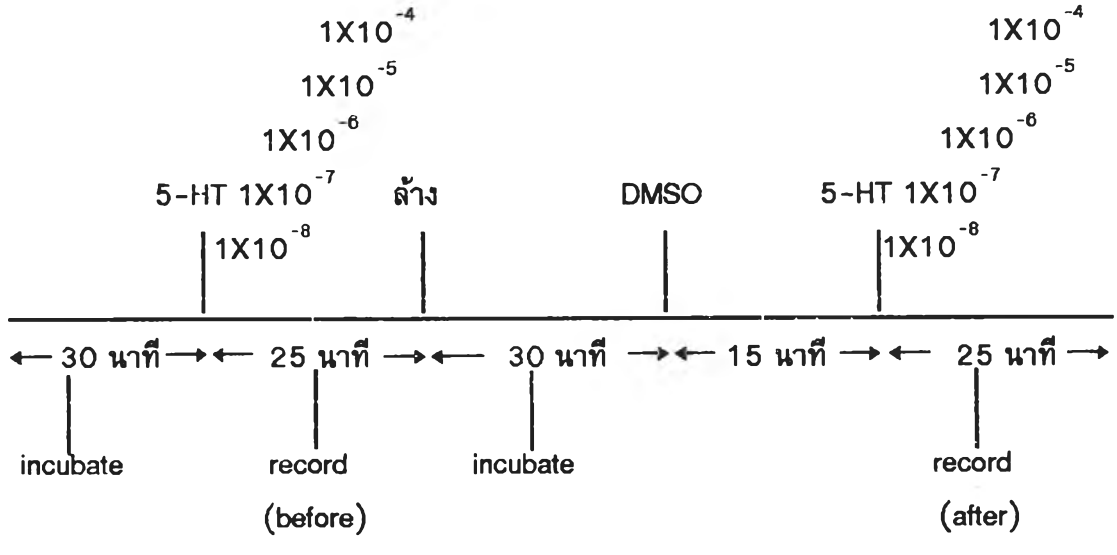
ตอนที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวที่แยกจากกาย เมื่อให้

สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin(5-HT) , norepinephrine(NE) และ calcium chloride ($CaCl_2$) ในสารละลาย potassium depolarizing

2.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ที่ใช้ในการละลาย 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของหลอดเลือดใหญ่เมื่อให้สารมาตรฐานการหดตัว serotonin (5-HT) , norepinephrine(NE) และ calcium chloride($CaCl_2$)ในสารละลาย potassium depolarizing

เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin(5-HT)

ศึกษา dose-response curve ของ 5-HT โดยเติมสาร serotonin (5-HT) ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ(1×10^{-8} -1×10^{-4} M)ลงในหลอดเลือดที่เตรียมไว้ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมสารเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นล้าง serotonin (5-HT) ด้วย Krebs-Henseliet solution หลาย ๆ ครั้ง incubate หลอดเลือด 30 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseliet solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดพักเต็มที ทำการศึกษาต่อไปโดยให้ตัวทำละลาย DMSO ลงในหลอดเลือดในปริมาตรเท่ากับ 6-deoxyclitoriacetal ที่ใช้ทดสอบ บันทึกผล 15 นาที แล้วจึงให้ serotonin (5-HT) ความเข้มข้นต่าง ๆ เช่นเดียวกับก่อนการให้ DMSO เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังจากการให้ DMSO (รูปภาพที่ 15)



(รูปภาพที่ 15)

เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว norepinephrine (NE)

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin (5-HT) (รูปภาพที่ 15) แต่เปลี่ยนจากสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin (5-HT) เป็น norepinephrine(NE) ($1X10^{-11}$ - $1X10^{-7}$ M)

เมื่อกระตุ้นด้วย calcium chloride($CaCl_2$) ในสารละลาย potassium depolarizing

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin (5-HT) (รูปภาพที่ 15) แต่เปลี่ยนจากสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin (5-HT) เป็น calcium chloride($CaCl_2$)ขนาดความเข้มข้น 0.1 mM, 1 mM, 10 mM, 20 mM และ 30 mM โดย incubate หลอดเลือดด้วย calcium-free Kreles-Hensleit solution จนกล้ามเนื้อหลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่ จึงเปลี่ยนเป็นสารละลาย potassium depolarizing incubate หลอดเลือดจนกระทั่งกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่มีแรงตึงตัวคงที่ และทำการศึกษาผลการหดตัวของหลอดเลือดโดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์แบบสะสม (cumulative dose-response curve) ที่ขนาดความเข้มข้นดังกล่าว และล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Hensleit solution หลายครั้ง ๆ จนหลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลาย calcium-free Krebs-Hensleit solution จนกระทั่งหลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่ จึงเปลี่ยนเป็นสารละลาย potassium depolarizing ทำการศึกษาโดยให้ DMSO 15 μl ก่อน นานประมาณ 15 นาที และจึงให้สารละลายแคลเซี่ยมคลอไรด์แบบสะสมขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ

2.2 ศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้น serotonin (5-HT) , norepinephrine (NE) และ calcium chloride ($CaCl_2$)ในสารละลาย potassium depolarizing

ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวในแต่ละการศึกษาเป็น serotonin (5-HT) ($1X10^{-8}$ - $1X10^{-4}$ M) , norepinephrine (NE) ($1X10^{-11}$ - $1X10^{-7}$ M) และ calcium chloride ($CaCl_2$)(0.1-30mM) ในสารละลาย

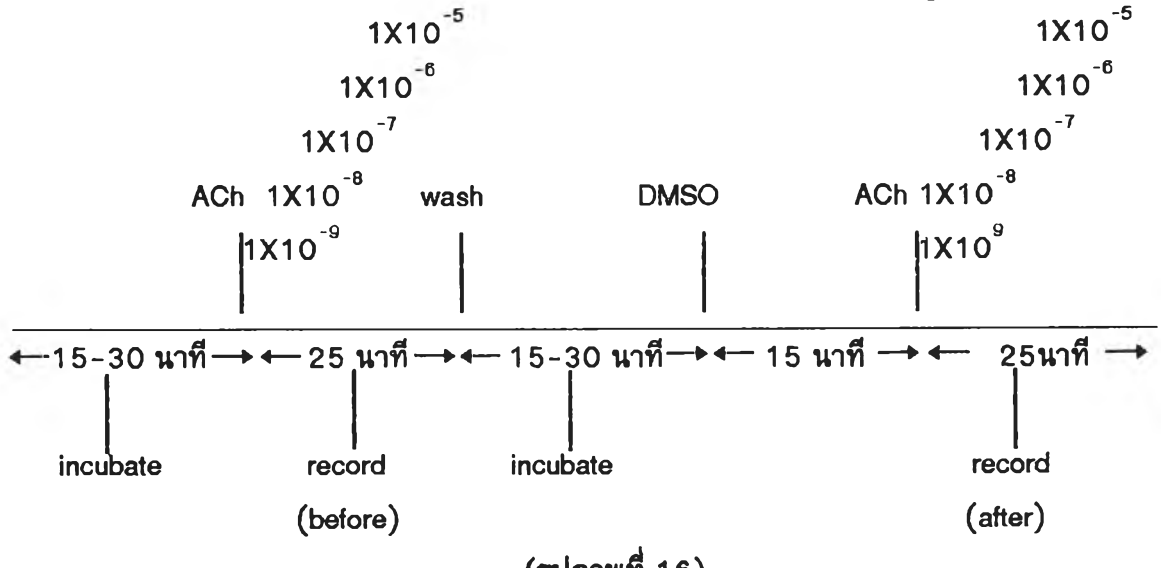
potassium depolarizing ในระหว่างการศึกษา และเปลี่ยนจากการให้ตัวทำละลาย DMSO เป็น 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 0.4 mg/ml (1.07×10^{-3} M)

<u>ตอนที่ 3</u> การศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) , serotonin(5-HT) และ histamine

3.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ที่ใช้ในการละลาย 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) , serotonin(5-HT) และ histamine

<u>เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh)</u>

เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) ที่ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ ($1X10^{-9}$ - $1X10^{-5}$ M) ลงในลำไส้ที่เตรียมไว้ทุก ๆ 5 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมสาร ล้างลำไส้ด้วย Tyrode's solution หลายๆ ครั้ง incubate ลำไส้ประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode's solution ทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้พักเต็มที่ศึกษาต่อไป โดยให้ตัวทำละลาย DMSO ในปริมาตรเท่ากับ 6-deoxyclitoriacetal ใช้ทดสอบลงในลำไส้ บันทึกผล 15 นาที แล้วให้ acetylcholine(ACh) ความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับก่อนให้ DMSO เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังจากการให้ DMSO (รูปภาพที่ 16)



(รูปภาพที่ 16)

เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว serotonin(5-HT)

ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับการศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh (รูปภาพที่ 16) แต่เปลี่ยนจากการให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) เป็น serotonin(5-HT) ($1X10^{-9}$- $1X10^{-5}$ M)

เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว histamine

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาผลของตัวทำละลาย DMSO ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) (รูปภาพที่ 16) แต่เปลี่ยนจากการให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) เป็น histamine ($1X10^{-9}$- $1X10^{-5}$ M)

3.2 ศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาที่แยกจากกาย เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นหดตัว acetylcholine(ACh) , serotonin(5-HT) และ histamine

ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1 แต่เปลี่ยนจากให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว acetylcholine(ACh) ($1X10^{-9}$- $1X10^{-5}$ M) เป็น serotonin(5-HT) ($1X10^{-9}$- $1X10^{-5}$ M) และ histamine ($1X10^{-9}$- $1X10^{-5}$ M) ในแต่ละการศึกษาและเปลี่ยนตัวทำละลาย DMSO เป็น 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 0.15 mg/ml (4.01×10^{-4} M)

3. การวัดผลและนำเสนอผลการวิจัย

1. การวัดผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก ซึ่งวัดได้ 2 ลักษณะ คือ

- วัดแรงในการหดตัวเฉลี่ย (tension)

$$= \frac{\text{ผลรวมของแรงในการหดตัวทุกครั้งในเวลาหนึ่ง}}{\text{จำนวนครั้งของการหดตัวในเวลาหนึ่ง}}$$

- วัดความถี่ในการหดตัว (frequency)

= จำนวนครั้งของการหดตัว (ครั้ง /นาที)

I 17538154

การนำเสนอผลการวิจัยจะนำเสนอดังนี้

- ร้อยละของแรงหดตัวในการหดตัวเฉลี่ย (tension)
- ร้อยละของความถี่ในการหดตัว (frequency)

2. การวัดผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่

วัดขนาดของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงเป็นมิลลิเมตร ของแต่ละความเข้มข้นของสารกระตุ้นการหดตัวมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ของการหดตัว(%contraction) โดยให้ maximum contraction = 100 %

การนำเสนอผลการวิจัยจะนำเสนอดังนี้

- dose-response curve ในรูปเปอร์เซนต์ของการหดตัว(% contraction)

3. การวัดผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum

วัดขนาดของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เป็นมิลลิเมตร ของแต่ละความเข้มข้นของสารกระตุ้นมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction) โดยให้ maximum contraction = 100 %

การนำเสนอผลวิจัยจะนำเสนอดังนี้

- dose-response curveในรูปเปอร์เซนต์ของการหดตัว(% contraction)

4. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

ผลการทดลองรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard error of mean)

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบก่อนและหลังได้รับ 6-deoxyclitoriacetal ใช้สถิติ student's paired-t test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 %