บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. <u>สัตว์ทดลอง</u>

1.1 หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar น้ำหนัก 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.2 หนูตะเภาเพศผู้ น้ำหนัก 250 - 400 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

2. <u>เครื่องมือ</u>

2.1 Organ Bath แบบ double Walled Harvard Type ประกอบด้วยหลอดแก้วสองชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อ เยื่อ(Physiological Solution) ที่มีความจุ 20 ml และมีช่องเปิดให้แก๊ส Carbogen (95%O_2 + 5%CO_2) ผ่านเข้าได้ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนซึ่งส่งมาจาก Water Bath โดยมี Thermoregulating Water Pump ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ ที่ 37°C ตลอดเวลาทำการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 9

2.2 Water BathชนิดThermo Bath modelSCBIพร้อม Thermoregulatingwater Pump Model 2E-NY ของบริษัท Little Giant Pump

2.3 ตัวรับสัญญาณวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ Isometrictransducer สำหรับ MacLab™

2.4 เครื่องแปลงสัญญาณ MacLab/4e™

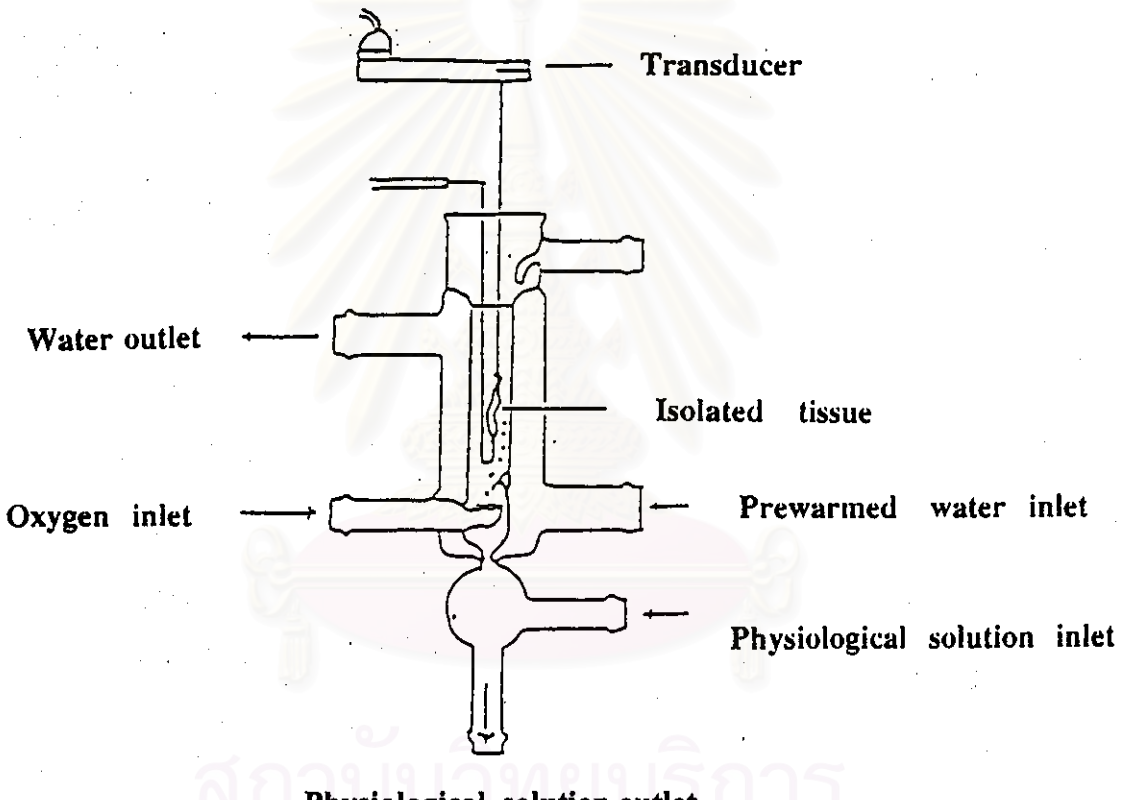
2.5 เครื่องปรับแต่งสัญญาณ MacLab™ Bridege Amp

2.6 เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผลไมโครคอมพิวเตอร์ Macintosh® รุ่น LC475

2.7 เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (Stimulator) Model S 101 และ Platinum Electrode

2.8 เครื่องชั่งละเอียด Metter AJ 180

2.9 ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก



รูปที่ 9 Organ Bath แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารเคมี

3.1 สารทดลอง

Capsaicin	(Sigma Chemical)
Ouabain	(Sigma Chemical)
Caffeine	(Sigma Chemical)
Reserpine	(Sigma Chemical)
Tyramine	(Sigma Chemical)

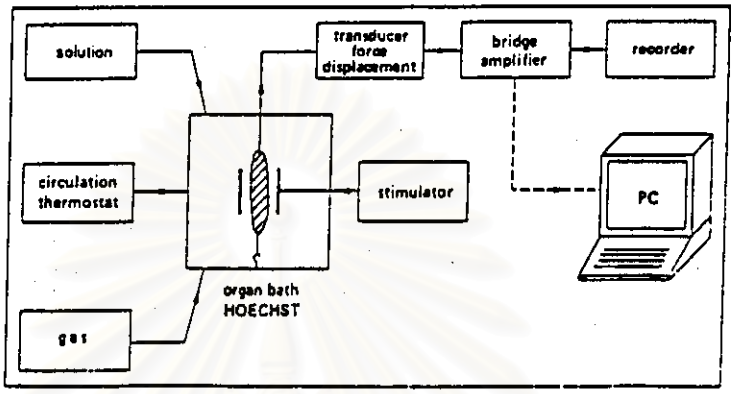
3.2 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในสารละลาย Kerbs-Henseleit Solution (KHS) ในอัตราส่วน mM ต่อ ลิตร (Litre)

-Sodium Chloride	118.00	mM/L
-Potassium Chloride	4.70	mM/L
-Magnesium Sulfate	1.64	mM/L
-Calcium Chloride	2.52	mM/L
-Sodium Bicarbonate	24.88	mM/L
-Potassium Dibasic Phosphate	1.18	mM/L
-Glucose	11.10	mM/L

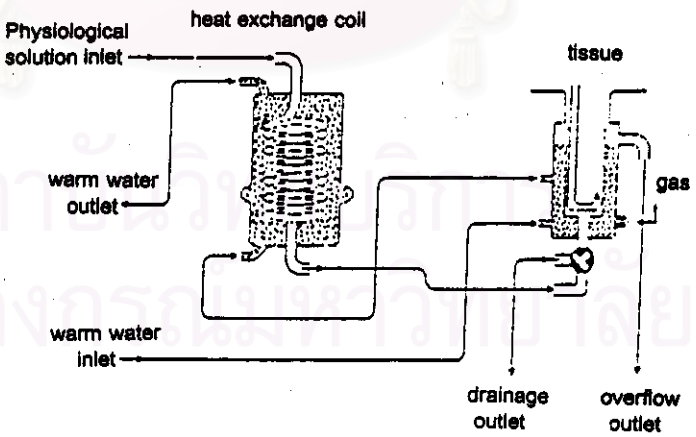
4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเตรียมหัวใจห้องบนขวาและซ้ายจากหนูขาวและหนูตะเภา

ทำหนูให้สลบโดยตีบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและศีรษะ แล้วดึงกระดูกคอให้หลุด เพื่อทำ Spinal Dislocation ผ่าตัดโดยเปิดเข้าสู่ช่องท้องเพื่อผ่านเข้าไปในช่องอก แล้วแยกนำหัวใจออกมาโดยตัดบริเวณเส้นเลือดใหญ่ Aorta กระตุ้นให้หัวใจบีบตัวเพื่อไล่เลือดภายในหัวใจห้องบนออกให้มากที่สุดในภาชนะที่มีสารละลาย KHS อยู่แล้วจึงนำมาใส่ใน Petri Dish ที่มีสารละลาย KHS และแก๊ส Carbogen ผ่านตลอดที่แยกหัวใจห้องบนขวาและซ้ายออกจากหัวใจห้องล่าง หลังจากนั้นจึงมาตัดแยกออกจากกันโดยที่หัวใจห้องบนขวาต้องมีการเต้นอยู่ตลอดเวลา



รูปที่ 10 แสดงวงจรการทดลอง,แปลผล และบันทึกผลการทดลอง



รูปที่ 11 แสดงวงจรการทำงานของ Organ Bath

4.1.1 การแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวา

ผูกปลายเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาด้านหนึ่งด้วยด้ายเพื่อนำไปผูกกับ Transducer ปลายอีกข้างหนึ่งผูกติดกับด้ายที่ทำเป็นห่วงขนาดความกว้างประมาณ 2 cm โดยมีทิศทางตามแนวการบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจ เพื่อนำลงไปเกี่ยวกับตะขอ (Hook) ที่ด้านล่างของ Organ Bath นำปลายเชือกด้านที่เหลือผูกติดกับ transducer ปรับเนื้อเยื่อหัวใจให้มีความตึงตัว (Tension) พอเหมาะ ประมาณ 1 กรัม ซึ่งในเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวานี้จะใช้ศึกษาอัตราการเต้นของหัวใจ โดยมีหน่วยการวัดเป็น ครั้งต่อนาที

4.1.2 การแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย

ผูกปลายข้างหนึ่งของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายด้วยด้ายเพื่อนำไปผูกติดกับ Transducer ปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย เกี่ยวด้วยแท่ง Platinum Electrode ตามแนวการบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจ แล้วนำไปใส่ใน Organ Bath โดยแยกขวาและซ้ายอย่างละอัน ต่อแท่ง Platinum Electrode กับเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า โดยใช้ขนาดศักดาไฟฟ้า 5 โวลท์ (V) ช่วงระยะเวลาของการกระตุ้นแต่ละครั้งเท่ากับ 5 มิลลิวินาที (msec) ความถี่ของการกระตุ้น 250 ครั้ง/นาที ปรับเนื้อเยื่อหัวใจให้มีความตึงตัวพอเหมาะประมาณ 1 กรัม ในเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายจะใช้ศึกษาแรงบีบตัวของหัวใจ

เมื่อแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายเรียบร้อยแล้ว ก่อนทำการทดลองสารทุกครั้งต้องให้เนื้อเยื่อหัวใจ ปรับตัวให้อยู่ในสภาวะทำงานคงที่ก่อนประมาณ 15-30 นาที รอจนกระทั่งการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจคงที่ จึงเริ่มทำการทดลอง โดยบันทึกการทำงานของหัวใจทั้งก่อนและหลังให้สาร

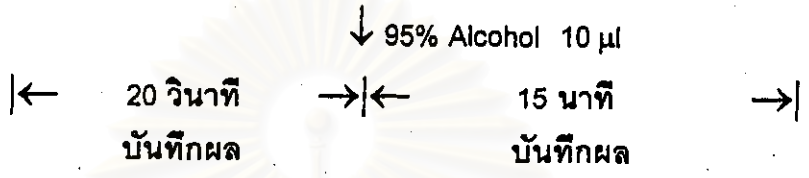
4.2 ศึกษาผลการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายในสภาวะปกติที่แยกจากหนูขาวและหนูตะเภา

เมื่อ Incubate จนหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 20วินาที เป็น Control แล้วบันทึกผลต่ออีก 15 นาที

|← 20 วินาที →|← 15 นาที →|
บันทึกผล บันทึกผล

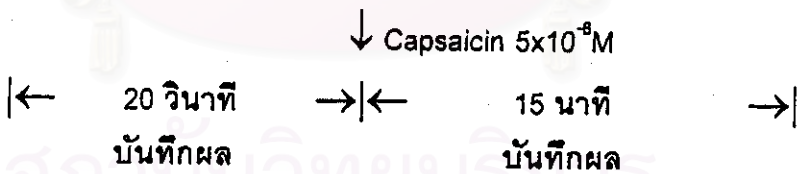
4.3 ศึกษาผลของ 95% Alcohol ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาว

เมื่อ Incubate จนหัวใจมีการทำงานที่คงที่แล้ว บันทึกผล 20 วินาที เป็น Control แล้วจึงให้ 95% Alcohol 10 µl ที่หัวใจทั้งสองข้าง แล้วบันทึกผลเป็นเวลา 15 นาที



4.4 ศึกษาผลของ Capsaicin ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาวและหนูตะเภา

เมื่อ Incubate จนหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการทำงานคงที่แล้ว บันทึกผล 20 วินาทีเป็นControl แล้วจึงให้ Capsaicin ขนาดความเข้มข้น $5x10^{-6}M$ ที่หัวใจทั้งสองข้างแล้วบันทึกผลการทดลองเป็นเวลา 15 นาที



4.5 ศึกษาผลของ Ouabain ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาวและหนูตะเภา

เมื่อ Incubate จนหัวใจทั้งห้องบนขวาและซ้ายมีการทำงานคงที่แล้ว บันทึกผล 20 วินาทีเป็น Control แล้วให้ Ouabain ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-6}M$ ในหัวใจห้องบนขวาและซ้ายแล้วบันทึกผลการทดลองเป็นเวลา 15 นาที

↓Ouabain 1 x10^{-6}M

|← 20 วินาที →|← 15 นาที →|

บันทึกผล บันทึกผล

4.6 ศึกษาผลของ Tyramine ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาว

หลังจากที่ Incubate จนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการทำงานคงที่แล้ว บันทึกผลเป็น Control ประมาณ 20 วินาที จึงให้ Tyramine ขนาดความเข้มข้น 1x10^{-5}M ทั้งหัวใจห้องบนขวาและซ้าย บันทึกผลการทดลองเป็นเวลา 15 นาที

↓Tyramine 1x10^{-5}

|← 20 วินาที →|← 15 นาที →|

บันทึกผล บันทึกผล

4.7 ศึกษาผลของ Tyramine และ Capsaicin ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาว หลังให้ Reserpine ขนาด 5 mg/kg ทาง IP 2 วัน

ฉีด Reserpine ขนาด 5 mg/kg ทาง IP เป็นเวลา 2 วัน จึงนำหนูขาวมาแยกหัวใจห้องบนขวาและซ้ายดังวิธีการศึกษาในข้อที่ 4.1 Incubate จนกระทั่งหัวใจมีการทำงานคงที่ทั้งหัวใจห้องบนขวาและซ้าย บันทึกผลการทดลองเป็น Control 20 วินาที แล้วจึงให้ Tyramine ขนาด 1x10^{-5}M บันทึกผลการทดลอง 15 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย KHS ทุก 15 นาที ในระหว่างการ incubate เป็นเวลา 30 นาที บันทึกผล 20 วินาที เป็น Control แล้วให้ Capsaicin ขนาด 5x10^{-6}M บันทึกผล 15 นาที

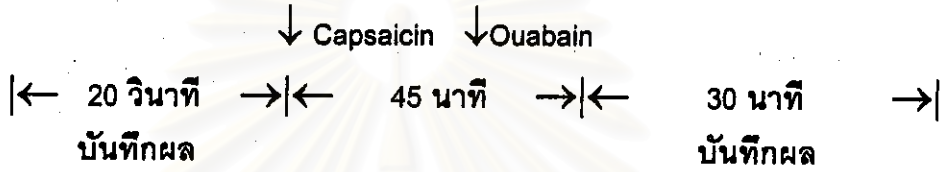
↓ Tyramine 1x10^{-5} M ↓Capsaicin 5x10^{-6}M

|←20 วินาที→|← 15 นาที →|← 30 นาที →|←20 วินาที→|← 15 นาที →|

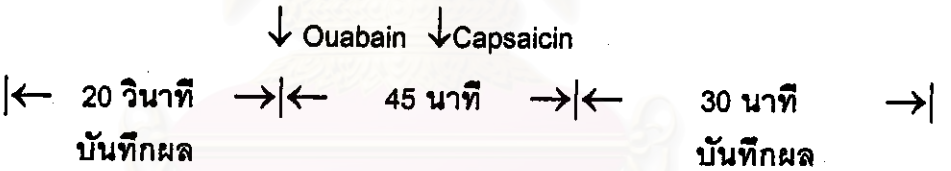
บันทึกผล บันทึกผล ล้าง บันทึกผล บันทึกผล

4.8 ศึกษาผลของ Capsaicin ร่วมกับ Ouabain ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาวและหนูตะเภา

เมื่อ Incubate จนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการทำงานคงที่แล้ว บันทึกผล 20 วินาทีเป็น Control จึงให้ Capsaicin ขนาดความเข้มข้น $5x10^{-6}$M แล้วตามด้วย Ouabain ขนาด $1x10^{-6}$M ภายในเวลา 45 วินาที การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของ Capsaicin ร่วมกับ Ouabain โดยให้ Capsaicin ก่อน



ศึกษาผลของ Capsaicin ร่วมกับ Ouabain โดยให้ Ouabain ก่อน

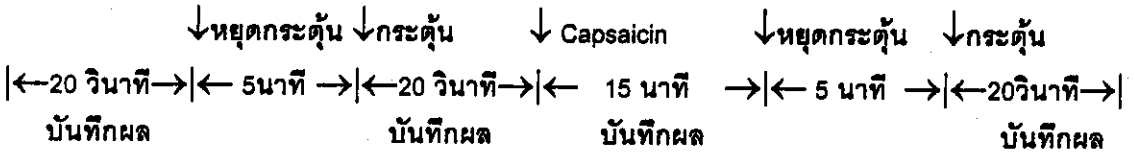


4.9 ศึกษาผลของ CapsaicinและCaffeine ต่อ Intracellular Calciumใน Sarcoplasmic Reticulum (SR) ของหัวใจห้องบนซ้ายที่กระตุ้นด้วยไฟฟ้า

เมื่อ Incubate หัวใจห้องบนซ้ายมีแรงบีบตัวที่คงที่แล้ว บันทึกผลเป็น Control 20 วินาที แล้วหยุดกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 5 นาที แล้วกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้าอีกครั้ง บันทึกผลการทดลอง 20 วินาที หลังจากที่มีการทำงานคงที่แล้ว ให้สาร Capsaicin หรือ Caffeine เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 5 นาที แล้วกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้าอีกครั้ง บันทึกผลเป็นเวลา 20 วินาที

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศึกษาผลของ Capsaicin ต่อ Intracellular Calcium ใน SR



ศึกษาผลของ Caffeine ต่อ Intracellular Calcium ใน SR

5. <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

ในแต่ละการศึกษาจะใช้จำนวนสัตว์ทดลองไม่น้อยกว่า 5 ตัว ($n \geq 5$) ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ยร้อยละ (%Response) ของอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายของสัตว์ทดลอง (%Response ± Standard Error Of Mean) สถิติที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการทดลองใช้สถิติ Student's Unpaired t-test โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย