บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1) สัตว์ทดลอง

ศึกษาในหนูเพศผู้พันธุ์ Wistar Furth จำนวน 84 ตัว น้ำหนัก 100-150 gm อายุ 1 - 2 เดือน จากศูนย์สัตว์ทดลองศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล

2) ซิลาซาพริล (CILAZAPRIL)

ได้มาเป็นผงจากบริษัท Roche Thailand Ltd.

3) สารเคมี

3.1 streptozotocin (STZ)

3.2 Heparin

3.3 Sodium pentobarbital

3.4 Normal saline solution (N.S.S)

3.5 Sodium citrate

3.6 Perfusate solution (Krebs-Henseleit solution) ประกอบด้วย

	mMol/L
NaCl	118.0
KCl	4.70
$CaCl_2$	2.52
$MgSO_4$	1.66
$NaHCO_3$	24.88
$KHCO_3$	1.18
$C_6H_{12}O_6$	5.58
Bovine serum albumin	2 gm/100 ml

(PH 7.4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4) เครื่องมือ

4.1 Polygraph (Nikhon RM 600)

4.2 Force transducer (Nikhon model TB 625 T)

4.3 Pressure transducer (Nikhon model TB 300 T)

4.4 Electromagnetic flow probe (Nikhon model FB-020 T)

4.5 Small animal respirator (Harvard rodent Ventilation model 685)

4.6 Heat exchanger

4.7 Woulff bottle with three necks

4.8 Reflolux

4.9 Polyethylene (Adams PE 50)

4.10 Gas tank (Carbogen)

4.11 Thermoregulator (Grant)

5) วิธีการทดลอง

5.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ศึกษาในหนูเพศผู้พันธุ์ Wistar furth จำนวน 84 ตัว น้ำหนัก 100-150 gm โดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มคือ

5.1.1 กลุ่มควบคุม (n=14) ได้แก่หนูที่ได้รับการฉีดสารละลายน้ำเกลือปกติ (normal saline solution,NSS) เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection)

5.1.2 กลุ่มเบาหวาน (n=14) (STZ-rats) ได้แก่หนูที่ได้รับการฉีด STZ 65 mg/kg bw.

5.1.3 กลุ่มหนูที่เป็นเบาหวานโดยได้รับการฉีด STZ 65 mg/kg bw. และได้รับยา cilazapril จำนวน 2.5 ,5,10 และ 20 mg/kg.bw/day หลังจากฉีด STZ ไปแล้ว 1 วัน (n=56)

โดยหนูที่ใช้ในการทดลองทั้ง 84 ตัว จะถูกงดอาหาร 1 คืน หลังจากนั้นกลุ่ม STZ จะได้รับการฉีด streptozotocin 65 mg/kg.bw เข้าทางช่องท้อง และการฉีดนี้จะกระทำเพียงครั้งเดียว ส่วนหนูกลุ่ม STZ-C จะได้รับการฉีด streptozotocin ด้วยขนาดเดียวกันในกลุ่ม STZ แต่จะได้รับการป้อนด้วย cilazapril จำนวน 2.5, 5, 10 และ 20 mg/kg.bw/day หลังจากฉีด streptozotocin 1 วัน เป็นประจำทุกวันจนถึงวันทำการทดลอง ในขณะที่กลุ่ม CONTROL จะได้รับการฉีดด้วยน้ำเกลือปกติ (normal saline solution) ในปริมาตรที่เท่ากับการฉีด streptozotocin เข้าทางช่องท้อง ซึ่งจะกระทำเพียงครั้งเดียวเช่นกัน หลังจากนั้นหนูทั้ง 3 กลุ่ม จะได้รับการเลี้ยงด้วยอาหารหนูตามปกติจนถึงวันทำการทดลอง

ระยะเวลาที่นำหนูทั้ง 3 กลุ่มมาศึกษาการทำงานของหัวใจและหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงหัวใจคือ 8 สัปดาห์และ 16 สัปดาห์ ดังแสดงในรูป 2.1

เกณฑ์การตัดสินภาวะเบาหวาน

1) ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของหนูต้องสูงกว่าหรือเท่ากับ 400 mg/dl วัดโดยใช้ Reflolux

2) มีภาวะต่อไปนี้ร่วมด้วย คือ กินอาหาร ดื่มน้ำและปัสสาวะบ่อย

5.2 การเตรียม Constant-pressure perfusion system

5.2.1 นำ perfusate solution ใส่ในขวด 3 ปาก (woulff bottle with three necks)

5.2.2 นำสายยางของถัง carbogen มาใส่ในปากขวดปากที่หนึ่งของขวด 3 ปาก ดังแสดงในรูปที่ 2.2 (a)

5.2.3 ต่อสายยางจากปากขวดที่สอง (b) ลงสู่หลอดแก้วทรงสูงที่ใส่น้ำสูง 100 เซ็นติเมตร เพื่อเป็นทางระบาย pressure เพื่อปรับ perfusion pressure

5.2.4 ต่อสายยางจากปากขวดปากที่ 3 (c) และปลายอีกข้างหนึ่งจะต่อเข้า กับทางเข้า thermoregulator (Grant)

5.2.5 ต่อสายยางจากท่อทางออกของ thermocontrol และปลายอีกข้างหนึ่งของสายยางต่อเข้ากับตัวเชื่อม 3 ทาง (three way)

5.2.6 ต่อสาย polyethylene (Adams PE 50) เข้ากับ three way เพื่อเป็นทางออกของ perfusate solution

5.2.7 นำ pressure transducer ต่อเข้ากับ three way ที่เหลือเพื่อวัด perfusion pressure

5.2.8 เปิด valve ของถัง carbogen เข้า system และปรับ pressure ให้อยู่ระหว่าง 70-90 มม.ปรอท

5.3 การดำเนินการทดลอง

ในวันทำการผ่าตัด ฉีดโซเดียมเพนโทบาร์บิทาล 30 mg/kg bw. เข้าทางช่องท้อง เพื่อทำให้หนูสลบจึงเริ่มการผ่าตัดบริเวณคอ ทำการเจาะคอและสอดท่อยางเข้าทาง หลอดลมและต่อเข้ากับเครื่องช่วยหายใจชนิด small animal respirator หลังจากนั้นจึง canulate หลอดเลือดแดง common carotid โดยใช้ท่อ polyethylene(Adam PE 50) แล้ว จึงต่อเข้ากับpressure transducer(Nikhon model TP-300T) ของเครื่อง polygraph (Nikhon RM 6000) เพื่อบันทึกค่า common carotid arterial pressure จากนั้นทำการผ่าตัดกระดูกสันอก (medial sternotomy) เลาะถุงเพอริคาร์เดียล (pericardial sac) ออกและใช้ flow probe (Nikhon model FB-020T)

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 mm คล้องบริเวณส่วนโค้งของเอออร์ตา(arch of aorta) เพื่อวัด aortic flow rate หลังจากนั้นตัดแยกหัวใจหนูออกมาต่อเข้ากับ perfusate system โดยอาศัยวิธี Modified Langendroff's ซึ่งใช้ constant perfusate pressure ที่ 70-90 mm.Hg

การตัดแยกหัวใจโดยวิธี modified Langendroff's เริ่มด้วยการคล้องด้ายที่ descending aorta และหลอดเลือดแดงสับเครเวียนข้างขวา (right subclavian artery) ดังแสดงในรูป 2.3 จากนั้นฉีด heparin เข้าทางเอเตรียมขวาและต่อเข้า perfusate system ต่อจากนั้นตัด right atrium ออกและผูกด้ายที่คล้องให้แน่นจึงตัดแยกหัวใจออกจากตัวหนูนำมาแขวนไว้รอให้หัวใจและ perfusate อยู่ในสภาพที่คงที่ประมาณ 10-15 นาที จึงทำการวัด coronary flow rate โดยตรง perfusate solution ที่มาจาก coronary sinus ทางเอเตรียม ขวาเป็นปริมาตรมิลลิลิตรต่อนาที ค่าที่ตวงได้ถือเป็นค่า coronary flow rate

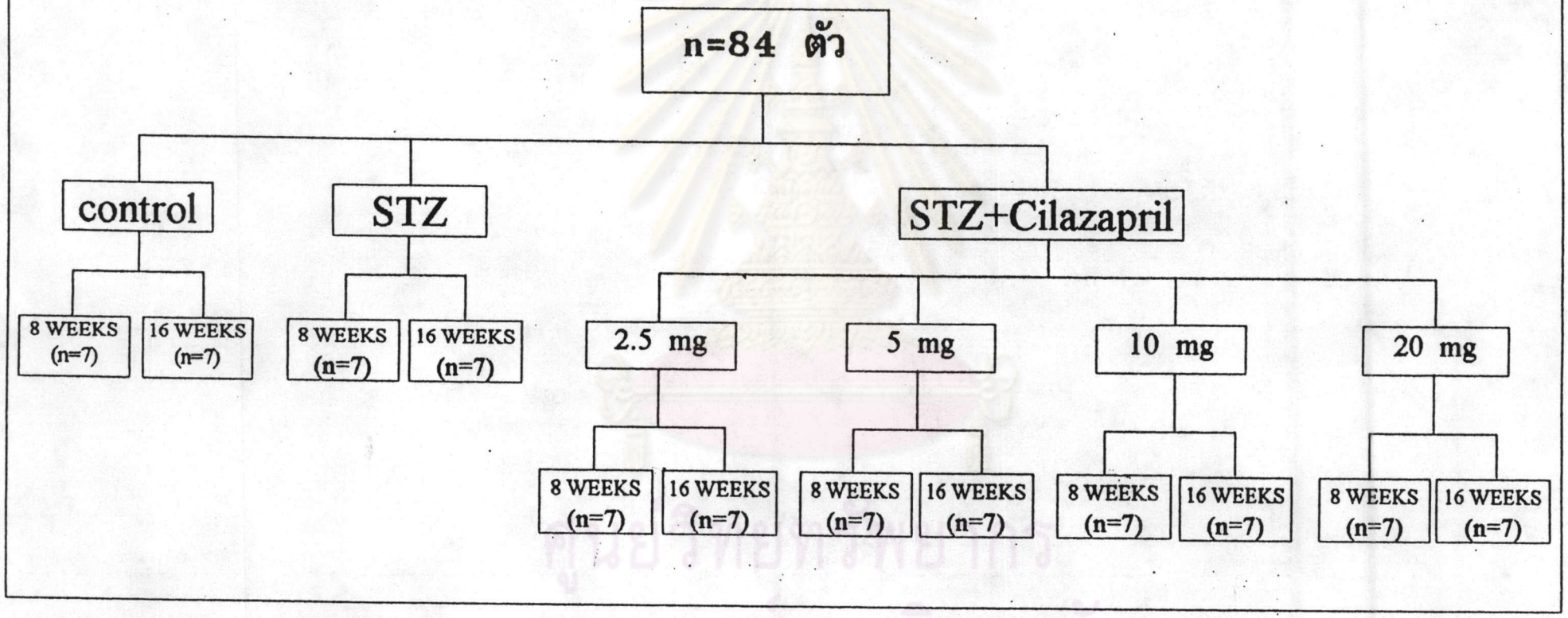
การวัดความแรงของการหดตัวของหัวใจห้องล่างซ้าย โดยใช้ตะขอลวดขนาด เล็กเกี่ยวกับ apex ของหัวใจห้องล่างซ้ายและต่อเข้ากับ isotonic transducer (Nikhon model TB-652T) ต่อเข้ากับเครื่อง polygraph (Nikhon RM 6000) โดยใช้ตุ้มน้ำหนัก 5 กรัมถ่วงตลอดเวลา เพื่อให้หัวใจตึงตัวพอดี(Beskett,1970) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

เมื่อเสร็จสิ้นการวัดการทำงานของหัวใจนำหัวใจออกจาก perfusate system แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก(wet weight) และตัดเป็นชิ้นตามขวางห่างจาก aortic junction 0.5 เซนติเมตร ด้วยความหนา 1 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.5เพื่อศึกษา left ventricle wall และcoronary artery

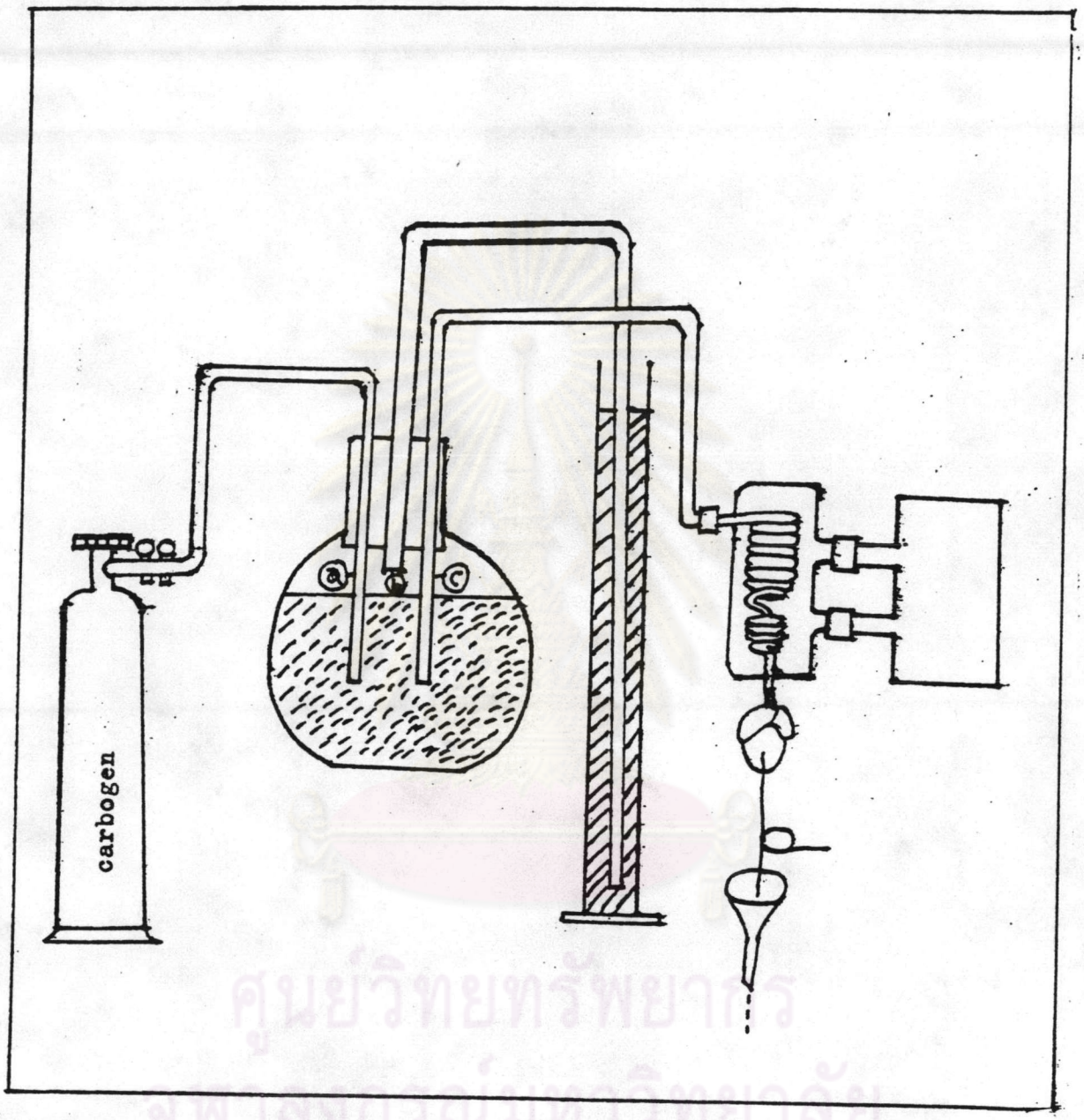
6) การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ค่า mean + standard error (SE) วิเคราะห์ข้อมูลของ systolic และ diastolic blood pressure,coronary และ aortic flow rate,ratio ของ heart weight ต่อ body weight,left ventricular contraction และ heart rate หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างในช่วงระยะเวลาเดียวกันระหว่างกลุ่ม CONTROL กับกลุ่ม STZ และระหว่างกลุ่ม STZ กับกลุ่ม STZ-C โดยใช้ student's unpaired t-test และใช้ค่า P ที่ น้อยกว่า 0.05 จึงถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

รูปที่ 2.1 แผนภูมิแสดงการแบ่งกลุ่ม ระยะเวลาที่ทำการทดลองและจำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม

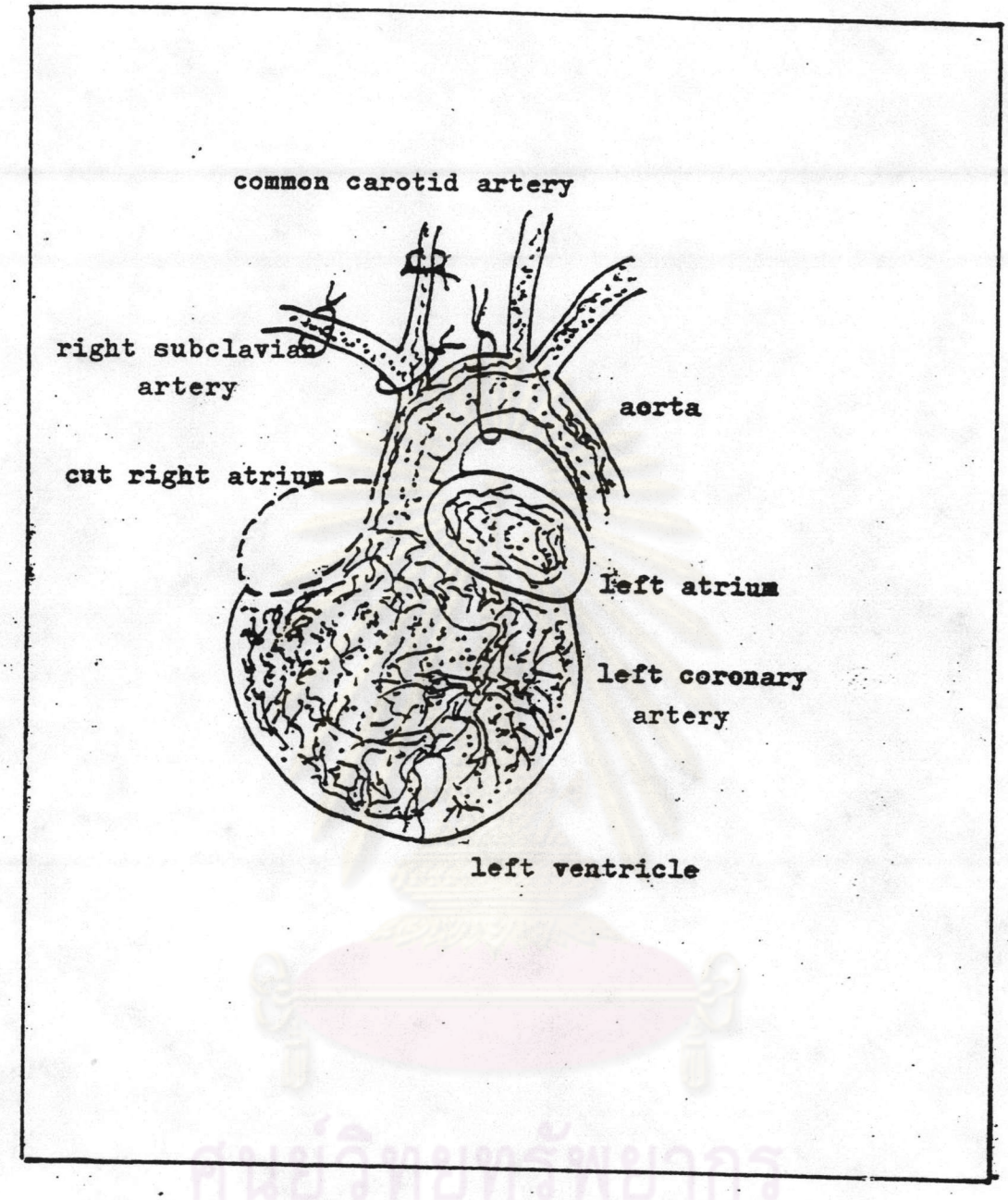


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

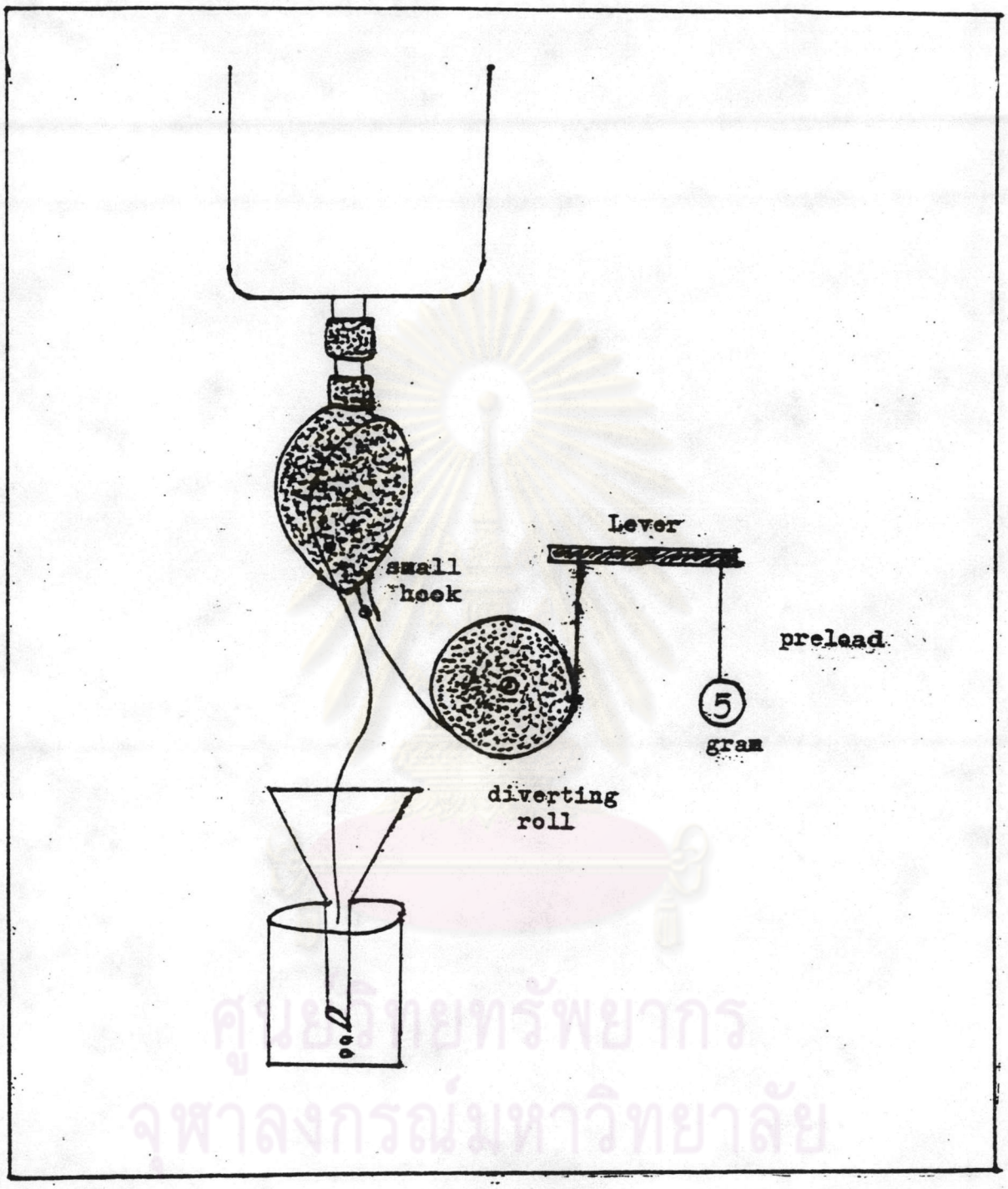


รูปที่ 2.2 แผนภูมิ constant pressure perfusate system

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

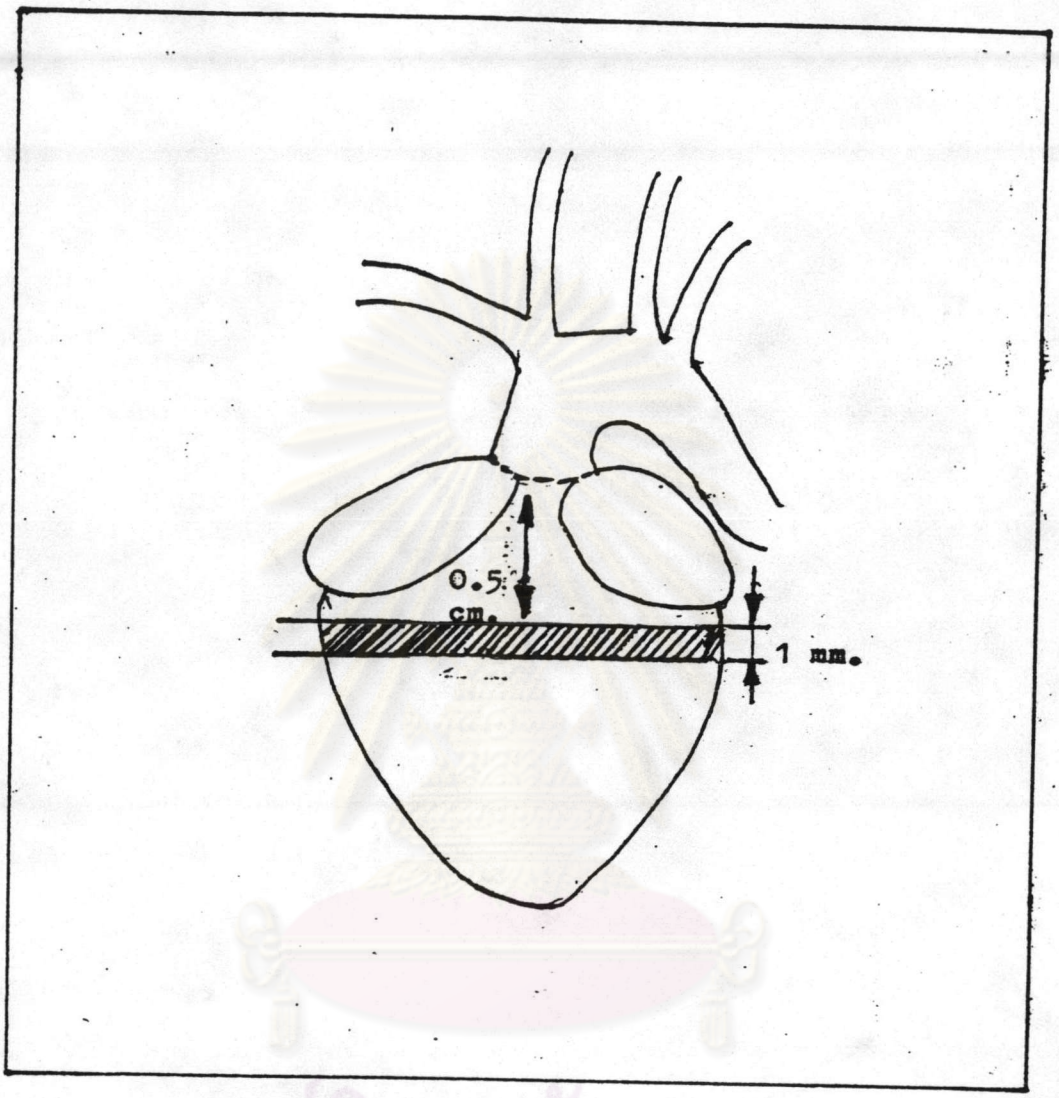


รูปที่ 2.3 การเตรียมและขั้นตอนการตัดแยกหัวใจหนูโดยวิธี modified Langendorff's method



รูปที่ 2.4 การวัด cardiac contraction

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.5 วิธีการตัดชิ้นส่วนหัวใจเพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย