บทที่ 2.

อุปกรณ์และวิธีทำการทดลอง

1. <u>สัตว์ทดลอง</u>

หนูแรทพันธุ์ wistar furth เพศผู้อายุประมาณ 1-2 เดือน น้ำหนัก 100-150 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล

2. <u>กระเทียม</u>

กระเทียม จากจังหวัดลำพูน

3. <u>สารเคมี</u>

3.1 Streptozotocin

3.2 Chloroform

3.3 Heparin

3.4 Nembutal (sodium pentobabital)

3.5 สารสกัดจากกระเทียม

3.6 Perfusate buffer (Krebs-Henseleit solution) ประกอบด้วย

NaCl	118.00	mMol/L
KCl	4.70	mMol/L
$CaCl_2$	2.52	mMol/L
$MgSO_4$	1.66	mMol/L
$NaHCO_3$	24.88	mMol/L
KH_2PO_4	1.18	mMol/L
$C_6H_{12}O_6$	5.85	mMol/L

Bovine serum albumin 2.00 gm/100 ml

3.7 $O_2 : CO_2 = 95 : 5$ %

4. <u>เครื่องมือ</u>

4.1 Blender

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

4.3 Gas tank (carbogen)

4.4 Hemoglucometer (Reflolux S) และ Hemoglucostip

4.5 Heat exchanger

4.6 Nikhon model TB 625 T

4.7 Polyethylene tube (Adams PE 50)

4.8 Polygraph (Nikhon RM 6000)

4.9 Pressure transducer
(Nikhon model TP 300 T)

4.10 Rota vapour

4.11 Seperator

4.12 Small animal respirator
(Havard rodent-ventilation model 685)

5. <u>วิธีการทดลอง</u>

5.1 <u>ประชากร (population) และ ตัวอย่าง (sample)</u>

การศึกษาครั้งนี้ใช้หนูแรทเพศผู้พันธุ์ Wistar Furth น้ำหนักประมาณ 100-150 กรัม จำนวน 54 ตัว โดยแบ่งหนูแรทออกเป็น 3 กลุ่มคือ

1. กลุ่มหนูควบคุม (CON , n=18) ได้แก่ หนูที่ได้รับการฉีดสารละลายน้ำเกลือปกติเข้าทางช่องท้อง

2. กลุ่มหนูเบาหวาน (STZ , n=18) ได้แก่ หนูที่ได้รับการฉีด streptozotocin ในขนาด 65 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. เข้าทางช่องท้อง

3. กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากกระเทียม (GAR , n = 18) ได้แก่ หนูที่ได้รับการฉีด STZ 65 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. เข้าทางหน้าท้อง และได้รับสารสกัดจากกระเทียมขนาด 100 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. ทางปาก หลังจากการฉีด streptozotocin ไปแล้ว 1 วัน สรุปเป็นแผนภูมิการแบ่งกลุ่มหนู ดังรูปภาพที่ 3

หมายเหตุ ในการทดลองแต่ละกลุ่มของช่วงอายุเวลา จะใช้หนูจำนวนกลุ่มละ 6 ตัว (n=6) ทั้งนี้ขนาดของจำนวนตัวอย่างนี้ประเมินได้จากผลสถิติของการทดลองที่ศึกษาโดย Hebden และคณะ ในปี คศ. 1990 ซึ่งเป็นการทดลองติดตามการเกิด atherosclerosis ในหนูเบาหวานซึ่งใช้ STZ เป็นสารเหนี่ยวนำเบาหวานในหนูพันธุ์ Wistar Furth เช่นเดียวกัน

5.2 <u>การสังเกตและการวัด (Observation and mesurement)</u>

5.2.1 ศึกษาผลของภาวะเบาหวานและผลของสารสกัดกระเทียมในหนูที่เป็นเบาหวานต่อการทำงานของหัวใจ โดยพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดการทำงานของหัวใจคือ

ก. Common Carotid Arterial Pressure (CAP)

ข. Heart Rate (HR)

ค. Aortic Flow Rate (AFR)

ง. Coronary Flow Rate (CFR)

จ. Left Ventricular Contraction (LVIC)

ฉ. Wet Weight of Heart/100 gm BW (R-value)

พารามิเตอร์ที่ ก, ข และ ค. ทำการวัดขณะ Intact Heart
พารามิเตอร์ที่ ง และ จ. ทำการวัดขณะต่อเข้ากับ Perfusate System
และพารามิเตอร์ที่ ฉ. ทำการชั่งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

5.2.2 ศึกษาผลของภาวะเบาหวานและผลของกระเทียมในหนูที่เป็นเบาหวานต่อระดับของไขมันซีรัม รวมทั้งระดับของโปรตีนในปัสสาวะ พารามิเตอร์ที่วัด ได้แก่

ก. Cholesterol

ข. TG

ค. HDL-C

ง. LDL-C

จ. Protein in urine

(หมายเหตุ การตรวจระดับของไขมันในเลือดและโปรตีนในปัสสาวะส่งตรวจที่บริษัทกรุงเทพอาร์ไอเอโดยมี internal QC : ทำเป็นประจำทุกวัน + คำนวณ SD และ x ทุกเดือน (SD<10 %) และ external QC : เข้าโครงการของคณะเทคนิคการแพทย์มหิดล ค่า vis โดยเฉลี่ยของ Lab อยู่ที่เกรด A - B

5.2.3 เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของหลอดเลือดในชั้น intramural coronary arteries โดยสิ่งที่จะศึกษาคือสังเกตขนาดของ lumen และความหนาของผนังของหลอดเลือด left coronary arteries โดยกล้อง light microscope ซึ่งได้ทำการตัดเตรียมชิ้นเนื้อหัวใจดังแสดงในรูปภาพที่ 7 และโดย Scanning electron microscope (Jeol JSM-T220A scanning) ซึ่งได้ทำการตัดชิ้นเตรียมชิ้นเนื้อหัวใจดังแสดงในรูปภาพที่ 8 เฉพาะกลุ่ม 16 สัปดาห์ (n=9)

5.3 <u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

หนูที่ใช้ในการทดลอง 54 ตัว หลังจากงดน้ำและอาหาร 1 คืน วันรุ่งขึ้น(วันที่ 1) นำหนูมาทำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด streptozotocin (65 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.) เข้าทางช่องท้อง
วันที่ 2 ทดสอบระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหนูในกลุ่มที่ได้รับ streptozotocin โดยการใช้ hemoglucometer (Reflolux S) และ hemoglucostip หลังจากนั้นจึงแบ่งกลุ่มของหนูที่เป็นเบาหวานตามเกณฑ์การตัดสินออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 18 ตัว โดยหนูเบาหวานกลุ่มหนึ่งจะได้รับการป้อนสารสกัดจากกระเทียมทางหลอดอาหาร (esophagus tube) ในขนาด 100 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.ต่อวัน ทันทีหลังจากทำการทดสอบและแบ่งกลุ่ม และหนูในกลุ่มนี้จะได้รับการป้อนสารสกัดกระเทียมต่อไปทุกวันจนถึงเวลาที่ทำการศึกษาทดลอง

โดยหนูทุกกลุ่มจะได้รับการเลี้ยงด้วยอาหารหนูและน้ำตามปกติทุกวันเหมือนกันเมื่อถึงวันครบกำหนดเวลาที่จะนำมาทำการศึกษาการทำงานของหัวใจและตรวจสอบหาปริมาณไขมันและพยาธิวิทยาของหลอดเลือด (8 , 12 และ 16 สัปดาห์)

<u>เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินภาวะเบาหวาน</u> คือ

1. น้ำตาลในเลือดของหนูต้องสูงกว่าหรือเท่ากับ 400 มก.ต่อดล. วัดโดยการใช้ hemoglucostrip และเครื่อง hemoglucometer (Reflolux S)

2. มีอาการดังต่อไปนี้ร่วมด้วยคือ กินอาหารบ่อย ดื่มน้ำมาก และปัสสาวะบ่อย

5.4 <u>การเตรียมสารสกัดจากกระเทียม</u>

5.4.1 นำกระเทียมสดแกะกลีบ แยกส่วนที่ฝ่อทิ้งไป นำไปล้างน้ำให้สะอาดและผึ่งให้แห้ง

5.4.2 นำกระเทียมสดมา 100 กรัม ผสมกับ chloroform 120 ml นำไปปั่นด้วย blender จนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

5.4.3 แยกส่วนกากและตะกอนออกโดยการกรองด้วยผ้าขาวบางพับหนา 4 ทบ

5.4.4 นำมาแยกส่วนด้วยเครื่องแยก (separator) และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ตามลำดับ

5.4.5 นำมาแยก chloroform ออกด้วยเครื่อง Rota Vapour ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะได้ crude extract สีเหลืองเข้ม

5.4.6 ทดสอบ crude extract โดยนำมาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตราฐาน diallyl disulfide ด้วยวิธี Headdspace Gas-chromatographic analysis (GC) ภายใต้สภาพเดียวกันตลอด พบว่าได้ค่า retention time ของ peak เท่ากับ 4.73 จากนั้นนำสารสกัดจากกระเทียมที่ได้มาหาปริมาณของ diallyl disulfide พบว่า

มีอยู่ประมาณ 30 - 60 %

5.5 การเตรียม constant-pressure perfustion system

5.5.1 นำ perfusate solution ใส่ในขวดแก้ว 3 ปาก (woulff bottle with three necks)

5.5.2 ต่อสายยางจากถัง carbogen มาใส่กับปากขวดที่หนึ่ง (a) ของขวดแก้ว 3 ปาก ดังรูปภาพที่ 4

5.5.3 ต่อสายยางจากปากขวดแก้วปากที่สอง (b) ลงสู่กระบอกแก้วทรงสูงที่บรรจุน้ำสูง 100 เซ็นติเมตร เพื่อเป็นทางระบาย pressure ในการปรับ perfusate pressure

5.5.4 ต่อสายยางจากปากขวอแก้วปากที่สาม (c) ต่อเข้ากับทางเข้าของเครื่อง thermocontrol

5.5.5 นำสายยางจากท่อทางออกของเครื่อง thermocontrol ต่อกับปลายข้างหนึ่งของตัวเชื่อมสามทาง (three way)

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

5.5.7 นำ pressure transducer ต่อเข้ากับ three way ที่เหลือเพื่อวัด perfusate pressure

5.5.8 เปิด valve ของถัง carbogen เข้า system และปรับ pressure ให้อยู่ระหว่าง 70-90 มิลลิเมตรปรอท

5.6 วิธีการทดลอง

การศึกษาการทำงานของหัวใจ

วันที่ผ่าตัดทำให้หนูสลบด้วย sodium pentobarbital ขนาด 30 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.เข้าทางช่องท้อง (อาจเสริมขนาดของยาสลบในขณะที่ทำการทดลองเพื่อคงไว้ซึ่งภาวะสลบ) เริ่มทำการผ่าตัดบริเวณคอเพื่อทำการเจาะคอและสอดท่อ (Polyethylene tube) เข้าทางหลอดลม หลังจาก

นั้นต่อเข้ากับเครื่องช่วยหายใจชนิด small animal respirator ทันที (Havard Rodent Model 693) จากนั้นทำการผ่าตัดกระดูกสันอก (medial sternotomy) และค่อยๆเลาะ pericardial sac ออกด้วยความระมัดระวัง เมื่อเปิดช่องอกได้จะเห็นหัวใจและหลอดเลือดดังรูปภาพที่ 5 คล้องด้ายที่หลอดเลือด right subclavian artery , right innominate artery และที่ ascending aorta ใช้ flow probe (Nikhon model FE - 020 T) ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. คล้องบริเวณส่วนโค้งของเอออร์ตาเพื่อวัด aortic flow rate หลอดเลือดแดง right common carotid artery จะถูก canulated ด้วยท่อ polyethylene (PE 180) ซึ่งหล่อท่อด้วย heparin ผสม normal saline (0.154 mol/L) หลังจากนั้นจึงต่อท่อนี้เข้ากับ pressure transducer (Nikhon model TP-300 T) ซึ่งต่อกับเครื่อง Polygraph (Nikhon RM 6000) เพื่อทำการวัด common carotid arterial pressure (CAP) เมื่อเสร็จการวัดความดันแล้วหัวใจของหนูจะถูกตัดแยกออกมาต่อกับ perfusate system โดยอาศัยวิธี Modified Langendorff's ความดันของ perfusate system ที่ใช้ประมาณ 70-90 มิลลิเมตรปรอท ตัวอย่างของเลือดหนูจะถูกเก็บทุกครั้งหลังทำการตัดแยกหัวใจนี้ทันที

วิธีการตัดแยกหัวใจ (MODIFIED LANGENDROFF ' S METHOD)

คล้องด้ายที่ arch of aorta และที่ right subclavian artery เมื่อต่อ perfusate system เข้าทาง right common carotid artery แล้วฉีด heparin 150 ยูนิต เข้าที่ right atrium และตัด right atrium ออก และรีบทำการผูกด้ายที่คล้องไว้ที่ aorta และ subclavian artery ให้แน่น หลังจากนั้นจึงตัดแยกหัวใจหนูออกจากตัวหนูนำมาแขวนไว้รอให้หัวใจ และ perfusate pressure อยู่ในสภาวะที่คงที่ประมาณ 10-15 นาที จึงทำการวัด coronary flow rate โดยการวัดปริมาณของ perfusate solution ที่ไหลออกมาจาก

coronary sinus เข้าสู่ right atrium เป็นปริมาณ มล.ต่อนาที ซึ่งถือว่าเป็นค่าของ coronary flow rate ดังแสดงในรูปภาพที่ 6

การวัดการหดตัวของหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricular isotonic contraction) วัดเป็น force of contraction โดยการใช้ลวดตะขอขนาดเล็กเกี่ยวเข้ากับ apex ของหัวใจ และต่อเข้ากับ isotonic transducer (Nikhon model TB - 652T) ต่อเข้ากับ polygraph (Nikhon RM-6000) โดยใช้ตุ้มน้ำหนักขนาด 5 กรัม เป็น preload เพื่อให้ได้ความตึงที่เหมาะสมดังรูปภาพที่ 6

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองในแต่ละครั้งหัวใจจะถูกนำไปชั่งหาน้ำหนัก (wet weight) ทันที จากนั้นทำการตัดแบ่งหัวใจโดยวัดจาก aortic junction ลงมา 0.5 เซนติเมตร แล้วตัดชิ้นหัวใจให้ผ่าน left ascending coronary หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร (ดังรูปภาพที่ 8) และนำไปแช่ใน 2.5 % glutaldehyde ใน phosphate buffer pH 7.5 เพื่อนำไปส่งตรวจทางพยาธิวิทยาที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยและเทคโนโลยี่

ก่อนการทดลองแต่ละครั้งตัวอย่างของปัสสาวะจะถูกเก็บโดยการใช้ metabolic case แยกเก็บปัสสาวะหนูแต่ละตัวในตอนเช้าและนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปหาปริมาณของ microprotein โดยวิธีทาง urine chemistry ที่เรียกว่า sulfosalicylic acid turbidity test

ตัวอย่างเลือดที่ได้นี้จะนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปหา lipid profile โดยวิธี enzymatic colorimetric technique

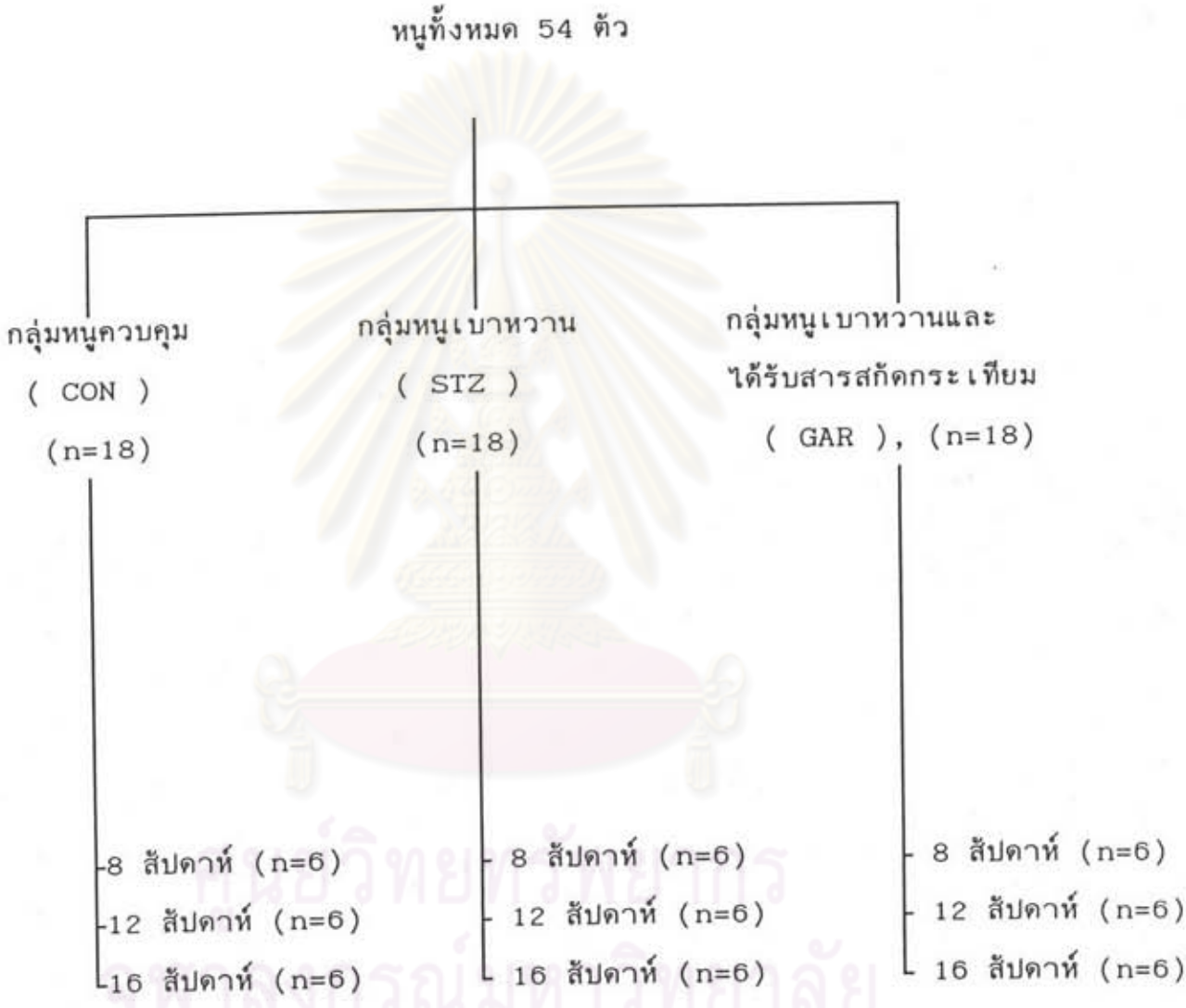
6. <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

แสดงผลการศึกษาด้วยค่า MEAN $\pm$ SD เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มทดลองด้วย student's , unpaired t - test ($p < 0.05$)

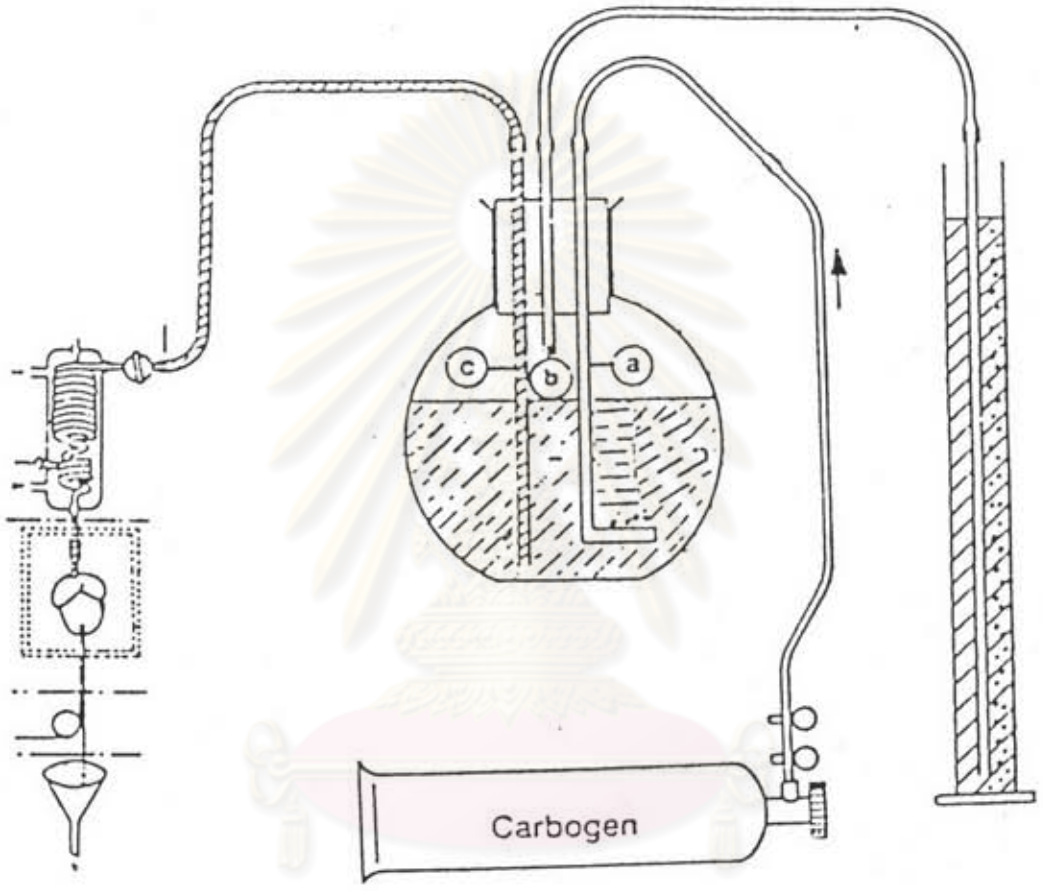
7. <u>รูปแบบการวิจัย</u>

การวิจัยเชิงทดลอง (experimental study)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

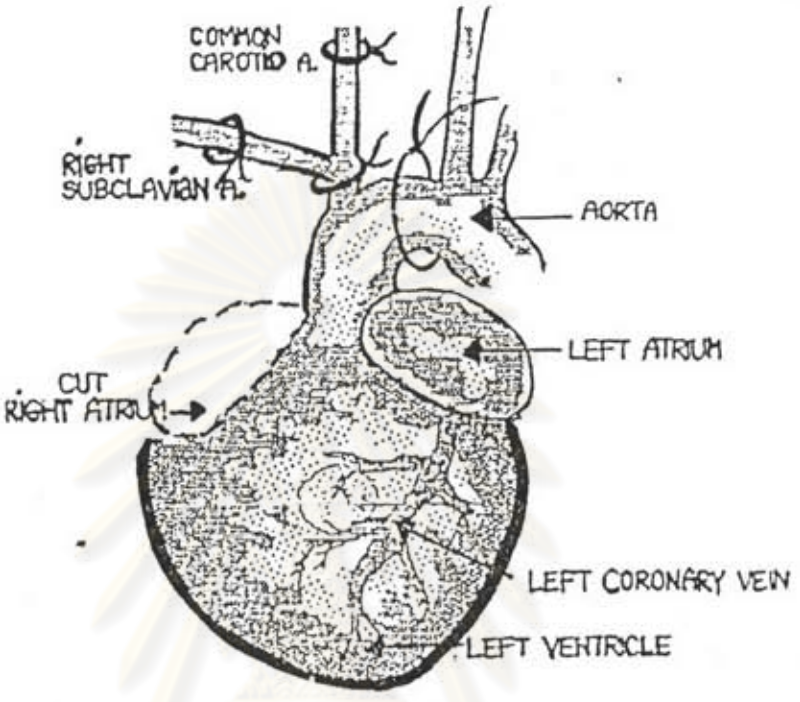


รูปภาพที่ 3 แผนภูมิการแบ่งกลุ่มหนูทดลอง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปภาพที่ 4 Constant Pressure Perfusate System

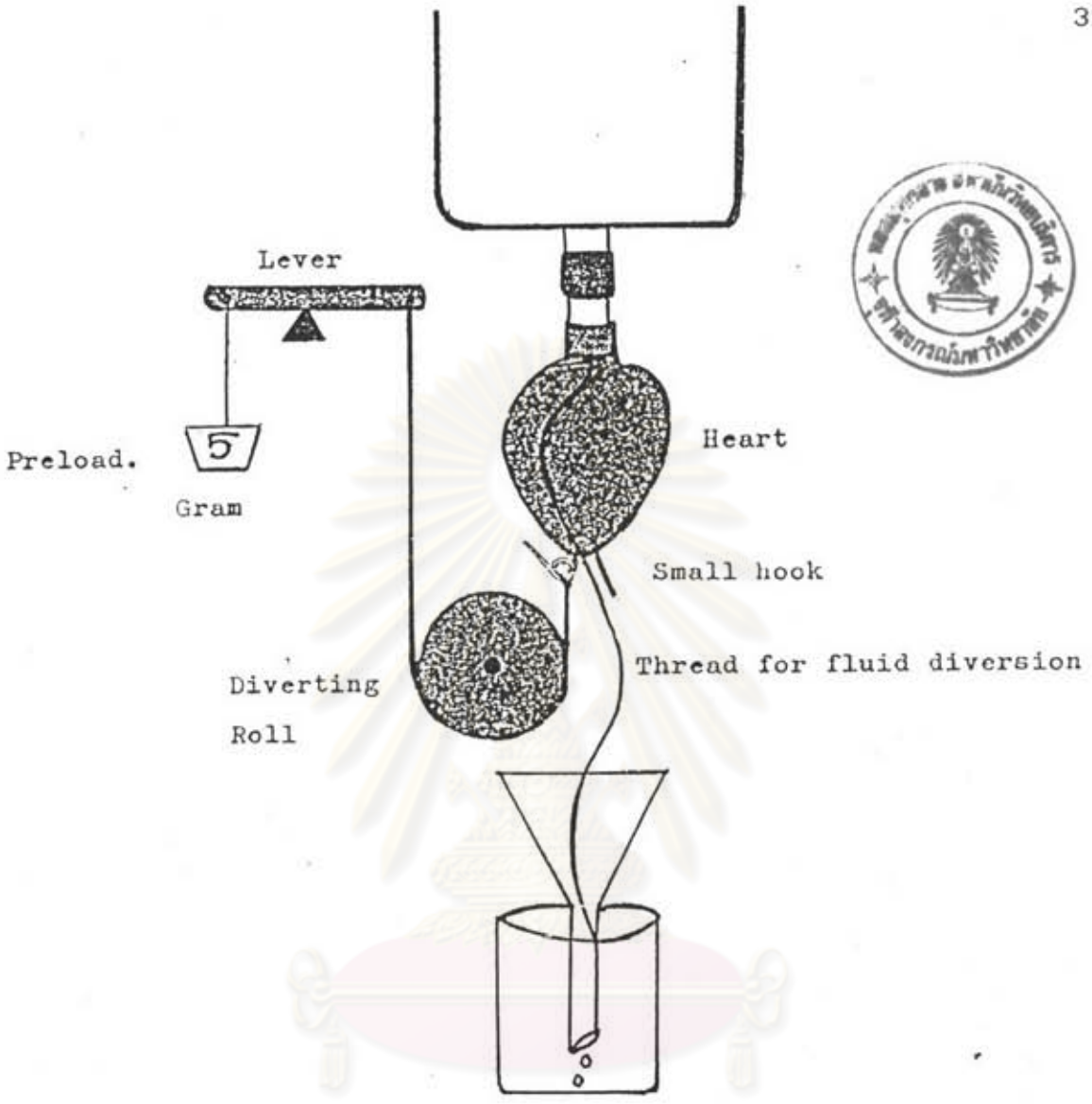


รูปภาพที่ 5 ขั้นตอนการตัดแยกหัวใจ

(modified Langendroff's method)

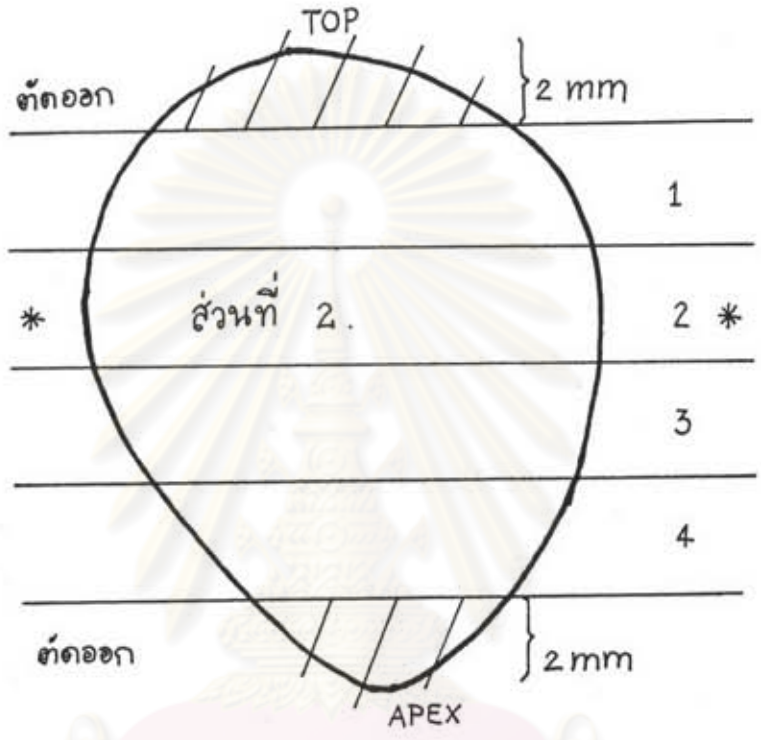
1. คล้องด้ายที่เส้นเลือดแดง aorta และ right subclavian
2. สอดท่อ PE-80 ในเส้นเลือดแดง common carotid
3. ตัด right atrium ออก
4. ผูกเส้นเลือดแดงที่ aorta และ right subclavian ทันที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



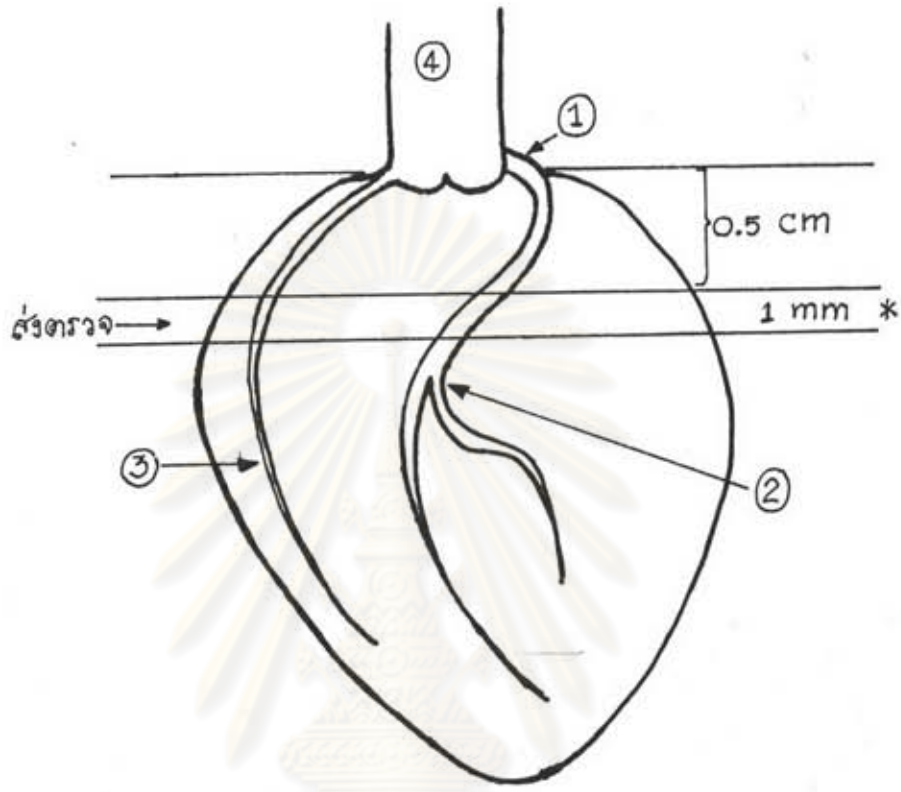
รูปภาพที่ 6 แสดงการวัดแรงหดตัวของหัวใจห้องล่างซ้ายแบบ isotonic

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 7 แสดงภาพจำลองการตัดชิ้นเนื้อหัวใจเพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา โดยกล้องจุลทัศน์แบบ Light microscope

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 8 แสดงภาพจำลองการตัดชิ้นเนื้อหัวใจเพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา โดยกล้องจุลทัศน์แบบ Scanning electron microscope

1. aortic junction 2. left coronary artery
3. right coronary artery 4. aorta

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย