หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารทดลอง

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 220 - 250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ต.ศาลายา อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม

กระต่ายเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 2,500 กรัม จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย

1.2 เครื่องมือ

Organ Bath : ในการทดลองนี้ใช้แบบ Double walled Harvard Type ซึ่งจะประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในมีความจุ 20 มิลลิลิตร เป็นชั้นที่จะบรรจุสารละลายที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Physiological solution) ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยจะมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำให้ไหลเข้าออกในชั้นนี้ organ bath จะมีช่องเป็นทางเปิดให้อากาศ (ก๊าซออกซิเจน 100% หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%, ก๊าซออกซิเจน 95%) ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นใน (รูปที่ 3)

Microsyringe ขนาด 10, 25, 50 ไมโครลิตร

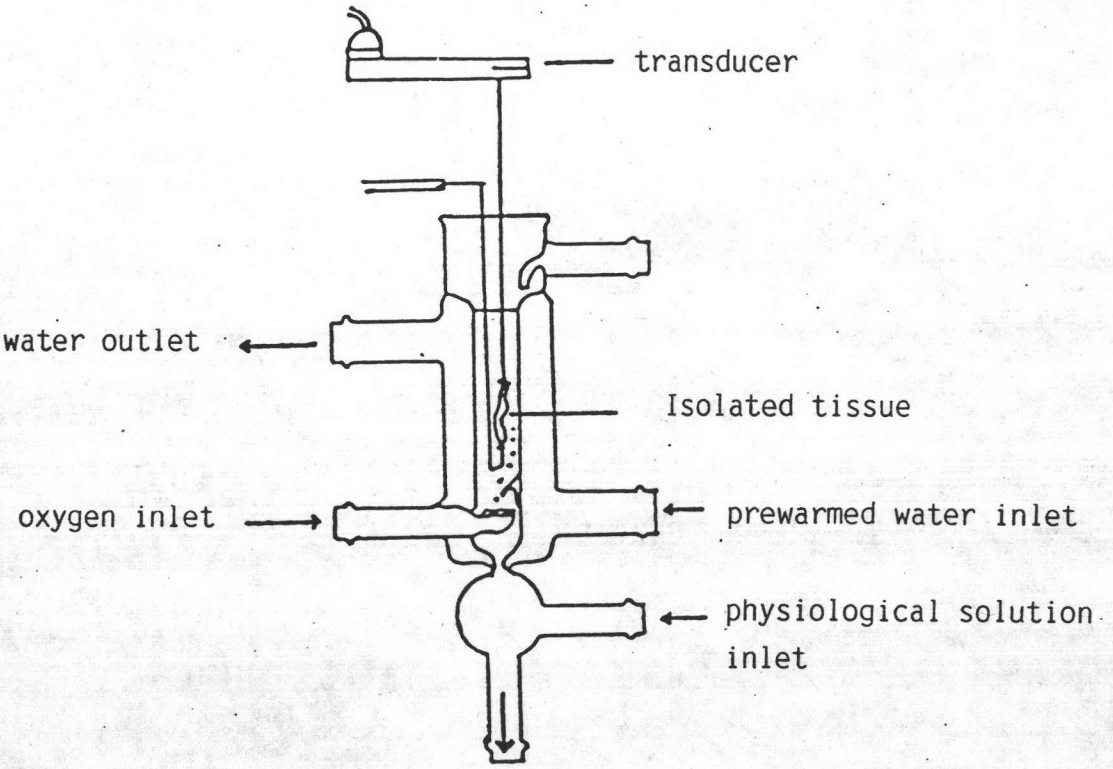
Isotonic transducer, Bioscience Model Washington Lever Transducer Type T2

Blood pressure transducer, Bioscience Model

Oscillograph recorder, Bioscience Model Washington 400 MD 2c

Cardioflex, Model ECG-5151

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 Organ Bath

1.3 สารทดลอง

แอนชิสโตรเทคโตรีน สารสกัดบริสุทธิ์ได้รับจากภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายของเกลือไฮโดร-คลอไรด์ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร pH ประมาณ 5.5

L-phenylephrine (Sigma)

Propranorol hydrochloride ภายใต้เครื่องหมายการค้า Inderal (ICI)

Calciumchloride-2-hydrat krist reinst (Merck)

Urethane (Sigma)

Heparin (Sigma)

1.4 การให้สารทดลอง

การทดลอง *in vivo* : เริ่มการทดลองหลังจากความดันเลือดของสัตว์ทดลองที่วัดได้คงที่ สารทดลองเข้าสู่สัตว์ทดลองโดยผ่านทางหลอดเลือดดำฟีมอรัล (femorol) และฉีดตามด้วยน้ำเกลือ 0.2 มิลลิลิตรทุกครั้ง

การทดลอง *in vitro* : หลังจากเนื้อเยื่อถูกปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีแล้ว จะเริ่มให้สารทดลองลงใน organ bath โดยใช้ microsyringe

2. วิธีการ

2.1 ศึกษาผลต่อความดันเลือดในหนูขาว

สลบสัตว์ทดลองด้วยยูรีเทน 1.4 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสัตว์ทดลอง โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง ในการทดลองที่กระทำในสัตว์สลบจำเป็นต้องสอดท่อโพลีเอธิลีน (polyethylene) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2 มิลลิเมตร, ยาว 5 เซนติเมตร เข้าทางหลอดลมที่ถูกเปิดบริเวณลำคอ เพื่อช่วยในการหายใจและกำจัดเสมหะที่จะมาขัดขวางต่อทางเดินหายใจ การให้สารทดลองเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ทดลองกระทำได้โดยการสอดท่อโพลีเอธิลีน (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มิลลิเมตร) ที่ปลายข้างหนึ่งจะตัดเป็นปลายแฉลบเข้าสู่หลอดเลือดดำฟิมอรัล ส่วนอีกปลายหนึ่งจะติดกับ three-way stop-cock และกระบอกฉีดยาที่บรรจุเต็มด้วยน้ำเกลือ (normal saline)

ที่ผสมแฮบพาริน (heparin , 100 i.u. ต่อมิลลิลิตร) สารต่าง ๆ จะถูกฉีดเข้าสู่สัตว์ทดลองผ่านทางหลอดเลือดดำ หลังจากนั้นสอดท่อโพลีเอธิลีน (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.6 มิลลิเมตร) เข้าสู่เส้นเลือดแดงคารอติด (carotid) เพื่อบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงความดันเลือด โดยผ่านทาง blood-pressure transducer การทดลองจะเริ่มขึ้นหลังจากความดันเลือดของสัตว์ทดลองที่บันทึกได้คงที่

ในการทดลองครั้งนี้ได้แบ่งสัตว์ทดลองเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยกลุ่มทดลองจะแบ่งเป็น 3 กลุ่ม

: ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดตามขนาดและเวลาของแอนซิสโตร-เทคโตรีน โดยจะให้สารเรียงกัน 4 ขนาด (dose) คือ 0.3, 0.6, 1.2 และ 2.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งให้แอนซิสโตรเทคโตรีนภายหลังจากการให้สารแต่ละขนาดนาน 30 นาที กลุ่มนี้จะบันทึกผลการทดลองที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

: ศึกษาฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบหัวใจและหลอดเลือดในช่วงสั้น ๆ คือ 15 นาที หลังจากการให้สารทดลองในการทดลองเหล่านี้จะตามด้วยน้ำเกลือ 0.2 มิลลิลิตรทุกครั้ง

: ศึกษาผลต่อความดันเลือดของแอนซิสโตรเทคโตรีนที่ให้ร่วมกับโปรปรานอรัล โดยให้โปรปรานอรัล 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าทางหลอดเลือดดำก่อนเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นให้แอนซิสโตรเทคโตรีน 2.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเวลา 15 นาที

กลุ่มควบคุมจะเป็นกลุ่มที่อยู่ในเงื่อนไขของเวลาและสภาวะการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง โดยให้น้ำเกลือ (pH 5.5) แทนสารทดลองที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ในปริมาณที่เท่ากัน

2.2 ศึกษาผลต่อความดันเลือดและคลื่นไฟฟ้าหัวใจในกระต่าย (Electrocardiography, ECG)

สลบสัตว์ทดลองด้วยยูรีเทน 1.75 กรัมต่อกิโลกรัมซึ่งฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่ใบหูอย่างช้า ๆ หลังจากนั้นให้ยาสลบเพิ่มอีก 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายยูรีเทน 25% เข้าทาง

หลอดเลือดดำฟีมอรัล ทุก 30 นาทีตลอดการทดลอง ในการเตรียมกระต่ายเพื่อวัดความดันเลือด กระทำเช่นเดียวกับในหนูขาว แต่ในกระต่ายจะสอดท่อเข้าทางหลอดเลือดแดงฟีมอรัล เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงความดันเลือด โดยจะให้แอนชิสโตรเทคโตรีนเรียงกัน 3 ขนาด คือ 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งให้แอนชิสโตรเทคโตรีนภายหลังจากการให้สารแต่ละขนาดนาน 30 นาที กลุ่มนี้จะบันทึกผลการทดลองที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 90 นาที เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในการเตรียมกระต่ายเพื่อบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจ เริ่มจากการจัดทำที่เหมาะสม โดยให้สัตว์ทดลองนอนหงายแล้วโกนขนบริเวณขาออกให้หมด ติดอิเลคโทรด (electrode) ให้แน่นกับขาโดยจัดให้อยู่ใน Lead III ของ standard limb lead (ติดอิเลคโทรดขั้วบวกไว้ที่ขาหลังซ้าย, ขั้วลบที่ขาหน้าซ้าย และขาหลังขวาเป็น ground) หลังจากนั้นให้เตรียมกระต่ายเพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดพร้อมกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (McLeod. et al, 1970) ในการทดลองกลุ่มนี้จะให้แอนชิสโตรเทคโตรีน 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าทางหลอดเลือดดำฟีมอรัล วัดผลการทดลองที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 10 นาที

2.3 ศึกษาผลต่อแรงตึงของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวที่แยกออกมา

เตรียมสัตว์ทดลองซึ่งถูกทำให้สลบโดยการตีที่บริเวณรอยต่อหัวและก้านคอ ผ่าตัดเปิดช่องอก พยายามเลาะตัดหลอดเลือดแดงใหญ่ทรวงอก (thoracic aorta) ให้ได้ยาวที่สุด แล้วนำมาใส่ใน petri-dish ที่บรรจุสารละลายเครบ (Kreb, ตารางที่ 1) และมีก๊าซออกซิเจน 95%, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลา สอดหลอดเลือดลงในแท่งแก้ว เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่าง ๆ ออกให้หมด ตัดหลอดเลือดในแนวเฉลียงให้มีขนาดกว้าง 2-4 มิลลิเมตร, ยาว 2 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้าง ปลายหนึ่งผูกติดกับขอเหล็กขนาดเล็กซึ่งอยู่ใน organ bath ปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อจะผูกติดกับ isotonic transducer หลอดเลือดแดงจะถูกดึงให้ตึงภายใต้แรงดึง 1 กรัมเป็นเวลา 60 นาทีก่อนการทดลอง ในการทดลองแต่ละครั้งจะให้สารกระตุ้น ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดก่อนเป็นกลุ่มควบคุม 1 ครั้ง หลังจากนั้นจะล้างเนื้อเยื่อหลาย ๆ ครั้งด้วยสารละลายเครบในขณะที่ให้เนื้อเยื่อคลายตัวมาอยู่ในระดับเดียวกันกับก่อนการทดลอง จึงเริ่มให้สารทดลองใน organ bath แช่เนื้อเยื่อนาน 15 นาที แล้วจึงให้สารกระตุ้นในปริมาณเท่ากับการให้ครั้งแรก

2.4 ศึกษาผลต่อแรงตึงของหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่ายที่แยกออกมา

เตรียมหลอดเลือดแดงเช่นเดียวกับข้อ 2.3 นำชิ้นหลอดเลือดมาดึงภายใต้แรงตึง 1.5 กรัมในสารละลายเครปเป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนสารละลายใน organ bath เป็นสารละลายดีโปลาไรด์ด้วยโปแตสเซียมที่ปราศจากแคลเซียม (High-Potassium Calcium-Free Depolarizing solution) (ตาราง 1) เปลี่ยนสารละลายทุก 5 นาที การทดลองจะเริ่มเมื่อความตึงของหลอดเลือดคงที่ (Sanner & Prusa, 1980)

2.5 ศึกษาผลต่ออัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนของหนูขาวที่แยกออกมา

เตรียมสัตว์ทดลองที่ถูกทำให้สลบโดยการตีบริเวณรอยต่อหัวและก้านคอ ผ่าตัดเปิดช่องอก รีบตัดแยกหัวใจออกจากสัตว์ทดลองใส่ลงใน petri-dish ที่บรรจุสารละลายลอค (Lock, ตารางที่ 2) และมีก๊าซออกซิเจน 100% แยกหัวใจห้องล่างและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกอย่างระมัดระวัง หลังจากนั้นแยกหัวใจห้องบนออกเป็นซ้ายและขวา นำหัวใจทั้ง 2 ส่วนนี้ไปใส่ใน organ bath ที่บรรจุสารละลายลอค มีก๊าซออกซิเจน 100% ผ่านตลอดและควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เนื้อเยื่อจะถูกดึงภายใต้แรงตึง 1 กรัมเป็นเวลา 30-60 นาทีระหว่างนี้จะมีการเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาที จนกระทั่งอัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจจะคงที่จึงจะเริ่มการทดลอง ในหัวใจห้องบนขวาซึ่งสามารถเต้นได้เองจะนำมาศึกษาฤทธิ์ของสารต่ออัตราการเต้นของหัวใจ ส่วนหัวใจห้องบนซ้ายจะนำมาศึกษาผลของสารต่อแรงบีบตัวของหัวใจโดยจะนำเครื่องกระตุ้นไฟฟ้ากระตุ้นให้เกิดการบีบตัวของหัวใจโดยผ่านทางอิเล็คโทรดที่เกี่ยวหัวใจไว้ ในการกระตุ้นไฟฟ้าใช้ square wave pulses, duration 5 millisecond, ความถี่ 240 ครั้ง/นาที และความแรงของการกระตุ้น 4 - 5 โวลต์ การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจที่เกิดขึ้นจะบันทึกผ่านทาง isometric transducer

2.6 ศึกษาผลต่อความสามารถในการนำกระแสประสาทของกล้ามเนื้อหัวใจในหนูขาว (Dromotropic effect)

เตรียมหัวใจห้องบนซ้ายเช่นเดียวกันกับข้างต้น กระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้าโดยใช้ square wave pulses, duration 1 millisecond, ความถี่ 250 ครั้ง/นาที และความแรงของการกระตุ้น (4 - 5 โวลต์) คงที่เป็นเวลานาน 30 นาที หลังจากนั้นให้เพิ่มความถี่ของการกระตุ้นขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ 250, 300, 350, 400, 450, 550 และ 650 ครั้ง/นาที

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายเครป (Kreb) ใน 1 ลิตร

สารเคมี	สารละลายเครป (มิลลิโมล)	สารละลายดีโปลาไรด์ (มิลลิโมล)
NaCl	112	17
KCl	5	100
$NaHCO_3$	25	25
KH_2PO_4	1	1
$MgSO_4$	1.2	1.2
$CaCl_2$	1.25	-
กลูโคส	11.5	11.5
	O_2 95% CO_2 5%	

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบสารละลายลอค (Lock) ใน 1 ลิตร

สารเคมี	สารละลายลอค (มิลลิโมล)
NaCl	155.8
KCl	5.6
$NaHCO_3$	1.8
$CaCl_2$	4.3
กลูโคส	5
	O_2 100%

โดยจะทิ้งให้หัวใจถูกกระตุ้นในแต่ละช่วงความถี่นาน 3 นาที ก่อนจะเพิ่มความถี่ต่อไป หลังจากเพิ่มการกระตุ้นถึงความถี่สูงสุดแล้วจะล้างเนื้อเยื่อด้วยสารละลายลอคหลาย ๆ ครั้ง และให้เนื้อเยื่อพักนาน 30 นาทีแล้วจึงเริ่มการทดลองอีกครั้ง โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในกลุ่มควบคุมจะเพิ่มความถี่ของการกระตุ้นในลักษณะเช่นเดียวกับครั้งแรก ส่วนกลุ่มทดลองจะให้แอนซิสโตรเทคโตรีนก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 15 นาที (Szekeres & Papp, 1975)

2.7 ศึกษาผลต่ออัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจของแอนซิสโตรเทคโตรีนที่ให้ร่วมกับโปรปรานอรัล

เตรียมการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.5 ให้โปรปรานอรัล 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก่อนการทดลอง 15 นาที หลังจากนั้นให้แอนซิสโตรเทคโตรีนเพื่อดูผลต่อการทำงานของหัวใจเป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งอยู่ในเงื่อนไขของเวลาและสภาวะการทดลองเหมือนกับกลุ่มทดลอง และให้ตัวทำละลายแทนสารทดลองในปริมาณเท่ากัน

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองจะรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of the means) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้ student's unpaired and paired t-test ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%