

## บทที่ 2

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

#### สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

##### 1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 250-300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

##### 2. เครื่องมือ

2.1 organ bath แบบ Double Walled Harvard Type ซึ่งประกอบด้วยหลอดแก้วสองชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายหล่อเลี้ยง (Physiological Solution) ที่มีความจุ 20 ml และมีช่องเปิดให้แก๊ส Carbogen (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) ผ่านเข้าได้ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนซึ่งส่งมาจาก Water Bath โดยมี Thermoregulating Water Pump ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ ที่ 37 °C ตลอดเวลาทำการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4

2.2 Water Bath ชนิด Thermo Bath model SCBI พร้อม Thermoregulating Water Pump Model 2E-NY ของบริษัท Little Giant Pump

2.3 ตัวรับสัญญาณวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ Isometric transducer สำหรับ MacLab™

2.4 เครื่องแปลงสัญญาณ MacLab/4e™

2.5 เครื่องปรับแต่งสัญญาณ MacLab™ Bridge Amp

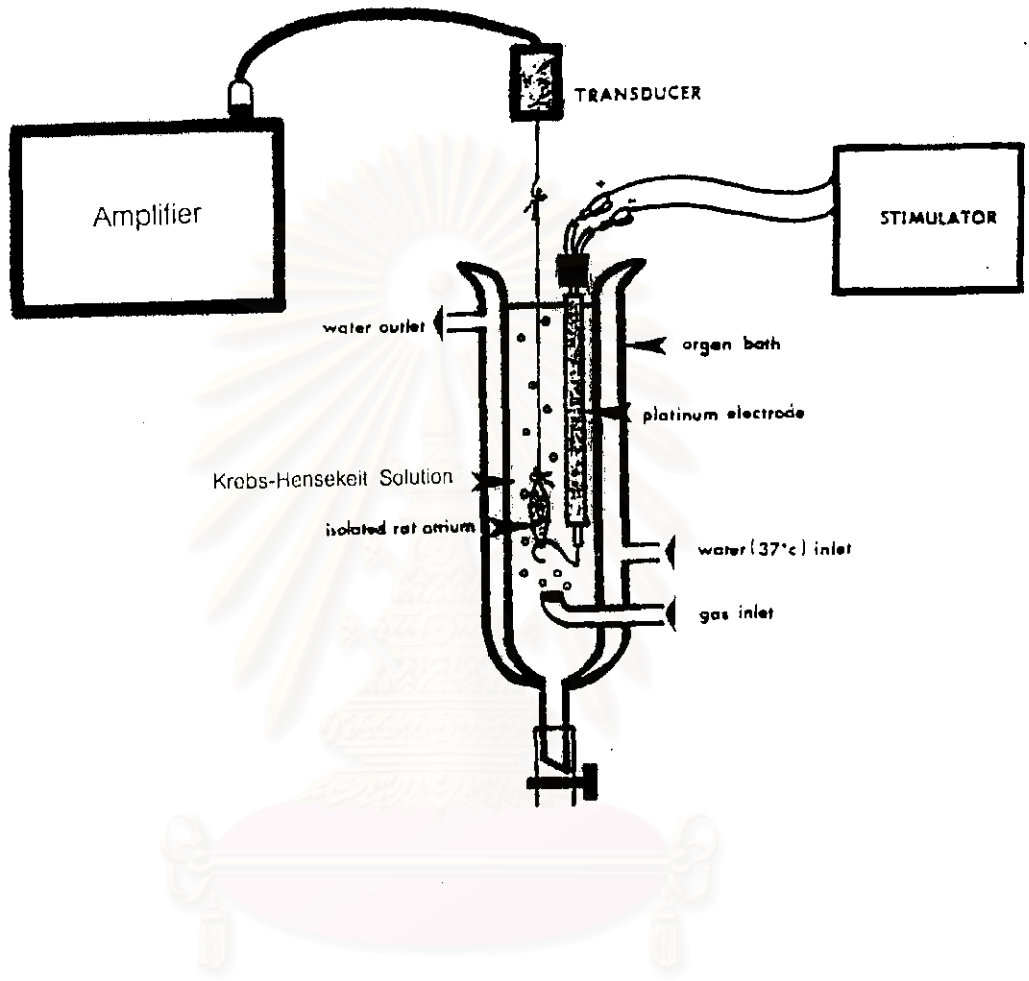
2.6 เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผลไมโครคอมพิวเตอร์ Macintosh® รุ่น LC

475

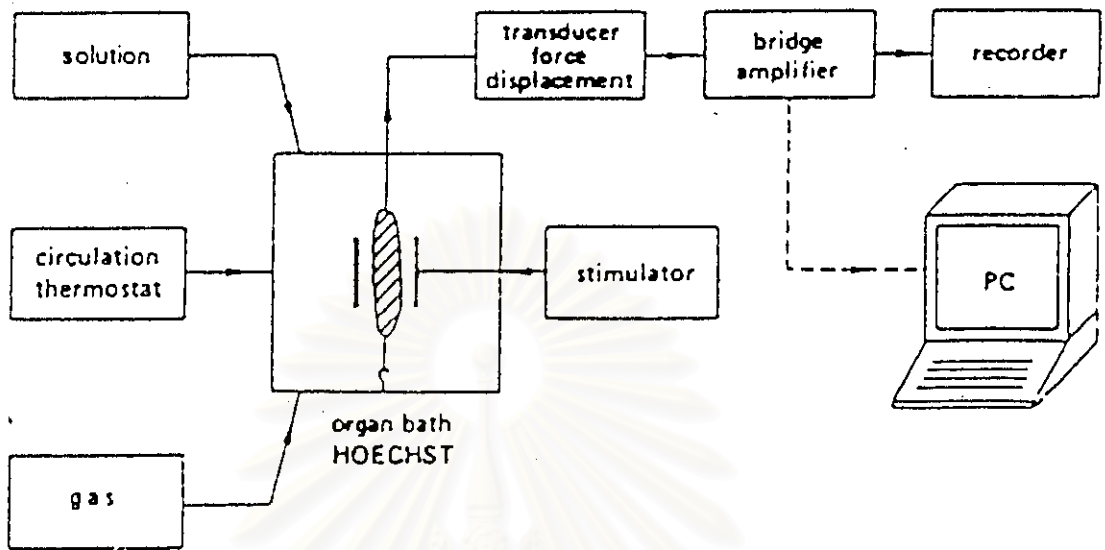
2.7 เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (Stimulator) Model S 101 และ Platinum Electrode

2.8 เครื่องชั่งละเอียด Metter AJ 180

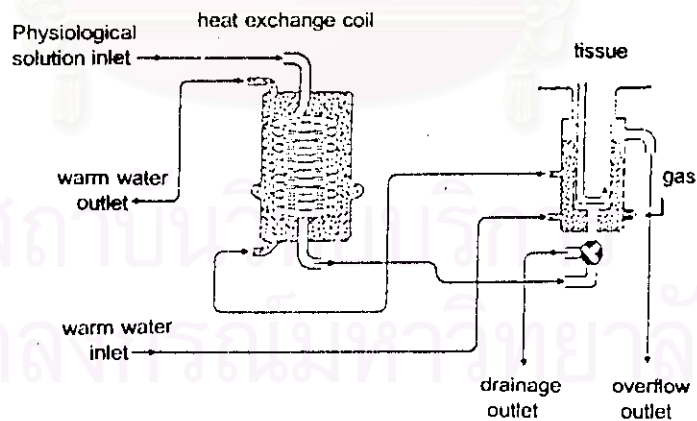
2.9 ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก (minor surgery instrument)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 4 แสดงลักษณะ organ bath



รูปที่ 5 แสดงเครื่องมือการทดลอง และการบันทึกผลการทดลอง



รูปที่ 6 แสดงการควบคุมอุณหภูมิภายใน organ bath

### 3. สารเคมี

#### 3.1 สารทดลอง

- CU-763-14-08 และ CU-763-2-14-11 ( เป็นสารบริสุทธิ์ ที่สังเคราะห์ โดย ผศ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเตรียมในรูปสารละลาย ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย )

- Propranolol ( Sigma )
- Amitriptyline ( Sigma )
- Reserpine ( Sigma )
- Tyramine ( Sigma )

3.2 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในสารละลาย Krebs-Henseleit Solution ( KHS ) ในอัตรา ส่วน mM ต่อลิตร ( 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	11.08	mM/L

#### 3.3 Gas

- Carbogen gas ( 95% oxygen+5% cabondioxide ) ของบริษัท TIG

### 4. วิธีดำเนินการวิจัย

#### 4.1 การเตรียมหัวใจห้องบนซ้ายและขวาจากหนูขาว

ทำหนูให้สลบโดยการตีคอ หลังจากนั้นผ่าตัดโดยเปิดเข้าสู่ทางช่องท้องเพื่อผ่านเข้าสู่ช่องอก แล้วแยกนำหัวใจออกมาโดยตัดที่บริเวณเส้นเลือดใหญ่ aorta กระตุ้นหัวใจให้บีบตัวเพื่อไล่เลือดภายในห้องหัวใจด้านบนออกให้หมดในภาชนะที่มีสารละลาย Krebs - Henseleit Solution

( KHS ) อยู่แล้วจึงนำมาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย KHS และ gas carbogen ผ่านตลอด แล้วจึงแยกหัวใจด้านล่างออกรวมทั้งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดอยู่ออกจนหมด แล้วจึงแยกหัวใจห้องบนขวา และซ้ายออกจากกันแล้ว

#### 4.1.1 การแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวา

- ผูกปลายเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาทั้งสองด้านด้วยด้าย โดยให้มีทิศทางตามแนวการบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจ
- ปลายข้างหนึ่งผูกเป็นห่วงขนาดพอควร นำลงไปเกี่ยวกับตะขอที่ด้านล่างของ organ bath ด้านใน
- ปลายอีกข้างหนึ่งผูกกับ force transducer
- ปรับเนื้อเยื่อหัวใจให้มีความตึงตัวพอเหมาะ ( tension ) เนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวานี้ใช้ศึกษาอัตราการเต้นของหัวใจ โดยมีหน่วยวัดเป็นครั้งต่อนาที ( beat per minute ; BPM )

#### 4.1.2 การแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย

- ผูกปลายของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายด้านหนึ่งด้วยด้ายแล้วนำไปผูกกับ force transducer
- ปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย เกี่ยวด้วยแท่ง platinum electrode ตามแนวการบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจ แล้วนำลงไปอยู่ใน organ bath อีกอันหนึ่ง
- ทำการต่อแท่ง platinum electrode กับเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า โดยใช้ขนาดศักดาไฟฟ้า 5 โวลต์ ( V ) ช่วงระยะเวลาการกระตุ้นแต่ละครั้งเท่ากับ 5 มิลลิวินาที ( msec ) ความถี่ของการกระตุ้น 250 ครั้งต่อนาที ( BPM )
- ปรับให้เนื้อเยื่อหัวใจมีความตึงตัวพอเหมาะ เนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายนี้ใช้ศึกษาแรงบีบตัวของหัวใจ เมื่อแขวนเนื้อเยื่อหัวใจเรียบร้อยแล้ว ก่อนทำการทดลองทุกครั้ง ต้องปรับให้เนื้อเยื่อหัวใจในสถานะที่คงที่ก่อนประมาณ 15-30 นาที รอจนกระทั่งการเต้นของหัวใจคงที่จึงเริ่มทำการทดลอง โดยการบันทึกการเต้นของหัวใจทั้งก่อนและหลังการให้ยา

#### 4.2 ศึกษาหา dose-response ของ CU-763-14-08 และ CU-763-14-11

เมื่อทำการ incubate หัวใจ จนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้ว บันทึกผลเป็น control 20 วินาที แล้วจึงให้ CU763-14-08 ขนาด  $3 \times 10^{-5}$  M บันทึกผลการทดลอง 15 นาที แล้วทำการทดลองแบบเดียวกันแต่เปลี่ยนขนาดเป็น  $5 \times 10^{-5}$  M และ  $1 \times 10^{-4}$  M ( ในการศึกษาหา dose response ของ CU763-14-11 ก็ทำเช่นเดียวกัน ) หลังจากนั้น นำผลการทดลองที่ได้ไป plot กราฟระหว่างขนาดของ CU763-14-08 และ CU763-14-11 กับ % response

----- incubate -----	บันทึกผล	----- CU-763-14-08 -----	บันทึกผล
15-30 นาที	20 วินาที	$1 \times 10^{-4}$ M	15 นาที

#### 4.3 ศึกษาผลของ CU-763-14-08 และ CU-763-14-11 ร่วมกับ Propranolol ต่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายของหนูขาว เปรียบเทียบกับการได้รับ Propranolol เพียงอย่างเดียว

เมื่อทำการ incubate หัวใจ จนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้ว บันทึกผลเป็น control 20 วินาที แล้วจึงให้ Propranolol  $1 \times 10^{-6}$  M ทิ้งให้ออกฤทธิ์ 5 นาที จึงเริ่มให้ CU-763-14-08 ขนาด  $1 \times 10^{-4}$  M แล้วบันทึกผลการทดลอง 15 นาที ( ในการศึกษาผลของ CU-763-14-11 ก็ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนจาก CU-763-14-08 เป็น CU-763-14-11  $1 \times 10^{-4}$  M )

----- incubate -----	บันทึกผล	----- Propranolol -----	บันทึกผล	----- CU-763-14-08 -----	บันทึกผล
15-30 นาที	20 วินาที	$1 \times 10^{-6}$ M	5 นาที	$1 \times 10^{-4}$ M	15 นาที

#### 4.4 ศึกษาผลของ CU-763-14-08 และ CU-763-14-11 ร่วมกับ Amitriptyline ต่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายของหนูขาว เปรียบเทียบกับการได้ Amitriptyline เพียงอย่างเดียว

เมื่อ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้ว บันทึกผลเป็น control 20 วินาที แล้วจึงให้ Amitriptyline  $1 \times 10^{-6}$  M ทิ้งให้ออกฤทธิ์ 3 นาที แล้วจึงให้ CU-763-14-08 ขนาด  $1 \times 10^{-4}$  M แล้วบันทึกผลการทดลองอีก 15 นาที ( ในการศึกษาผลของ

CU-763-14-11 ก็ทำเช่นเดียวกับ เพียงแต่เปลี่ยนจาก CU-763-14-08 เป็น CU-763-14-11  $1 \times 10^{-4}$  M แทน )

--- incubate ---- บันทึกผล ----- Amitriptyline ----- บันทึกผล ----- CU-763-14-08 ----- บันทึกผล  
15-30 นาที 20 วินาที  $1 \times 10^{-6}$  M 3 นาที  $1 \times 10^{-4}$  M 15 นาที

4.5 การศึกษาผลของ CU-763-14-08 และ CU-763-14-11 ร่วมกับ Propranolol และ Amitriptyline ต่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายของหนูขาว

เมื่อ incubate หัวใจ จนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่บันทึกผล เป็น control 20 วินาที แล้วจึงให้ Propranolol  $1 \times 10^{-6}$  M หลังจากนั้น 5 นาทีให้ Amitriptyline  $1 \times 10^{-6}$  M บันทึกผลต่ออีก 3 นาที จึงเริ่มให้ CU-763-14-08 ขนาด  $1 \times 10^{-4}$  M บันทึกผลการทดลองต่ออีก 15 นาที ( ในการศึกษาผลของ CU-763-14-11 ก็ทำเช่นเดียวกัน เพียงแต่เปลี่ยนจาก CU-763-14-08 เป็น CU-763-14-11  $1 \times 10^{-4}$  M แทน )

incubate-----บันทึกผล -----Propranolol ----- Amitriptyline ----- CU-763-14-08 -----บันทึกผล  
15-30นาที 20วินาที  $1 \times 10^{-6}$  M 5 นาที  $1 \times 10^{-6}$  M 3 นาที  $1 \times 10^{-4}$  M 15 นาที

4.6 ศึกษาผลของ Tyramine ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายของหนูขาว

หลังจากที่ incubate จนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการทำงานคงที่ แล้ว บันทึกผลเป็น control ประมาณ 20 วินาที จึงให้ Tyramine ขนาดความเข้มข้น  $1 \times 10^{-6}$  M ทั้งหัวใจห้องบนขวาและซ้าย บันทึกผลการทดลองเป็นเวลา 15 นาที

-----incubate ----- บันทึกผล ----- Tyramine -----บันทึกผล  
15-30 นาที 20 วินาที  $1 \times 10^{-6}$  M 15 นาที

4.7 ศึกษาผลของ CU-763-14-08 และ CU-763-14-11 ร่วมกับ Tyramine ต่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายของหนูขาว เปรียบเทียบการได้รับ Tyramine เพียงอย่างเดียว

เมื่อ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้ว บันทึกผลการทดลองเป็น control 20 วินาที แล้วจึงให้ CU-763-14-08 ขนาด  $1 \times 10^{-4}$  M บันทึกผล 5 นาที จึงเริ่มให้ Tyramine  $1 \times 10^{-6}$  M แล้วบันทึกผลการทดลอง 15 นาที ( ในการศึกษาผลของ CU-763-14-11 ก็ทำเช่นเดียวกันเพียงแต่เปลี่ยนจาก CU-763-14-08 เป็น CU-763-14-11  $1 \times 10^{-4}$  M แทน )

---- incubate -----	บันทึกผล -----	CU-763-14-08 -----	บันทึกผล -----	Tyramine -----	บันทึกผล -----
15-30 นาที	20 วินาที	$1 \times 10^{-4}$ M	5 นาที	$1 \times 10^{-6}$ M	15 นาที

4.9 ศึกษาผลของ Tyramine ต่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายในหนูที่ pretreated ด้วย Reserpine

ฉีด reserpine ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทาง IP เป็นเวลา 2 วันเมื่อครบวันที่ 2 นำหนูมาแยกเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนตั้งข้างด้านที่กล่าวมาแล้ว

เมื่อ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายเต้นคงที่แล้ว บันทึกผล 20 วินาทีเป็น control แล้วจึงให้ Tyramine ขนาด  $1 \times 10^{-6}$  M บันทึกผล 15 นาที

----- incubate -----	บันทึกผล -----	Tyramine -----	บันทึกผล -----
15-30 นาที	20 วินาที	$1 \times 10^{-6}$ M	15 นาที

4.9 ศึกษาผลของ CU-763-14-08 และ CU-763-14-11 ต่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายในหนูที่ pretreated ด้วย Reserpine

ฉีด reserpine ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทาง IP เป็นเวลา 2 วันเมื่อครบวันที่ 2 นำหนูมาแยกเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนตั้งข้างด้านที่กล่าวมาแล้ว



เมื่อ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายเต้นคงที่แล้ว บันทึกผล 20 วินาทีเป็น control แล้วจึงให้ CU-763-14-08 ขนาด  $1 \times 10^{-4}$  M บันทึกผล 15 นาที ( ในการศึกษา CU-763-14-11 ก็ทำเช่นเดียวกัน เพียงแต่เปลี่ยนจาก CU-763-14-08 เป็น CU-763-14-11  $1 \times 10^{-4}$  M แทน )

----- incubate ----- บันทึกผล ----- CU-763-14-08 ----- บันทึกผล  
15-30 นาที 20 วินาที  $1 \times 10^{-4}$  M 15 นาที

## 5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ในแต่ละการศึกษาจะใช้จำนวนสัตว์ทดลอง 8 ตัว ( $n = 8$ ) ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ( % response  $\pm$  standard error of mean ) การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการทดลองใช้ Student's paired t-test ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล 2 ชุด ใช้ Student's unpaired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ( $p < 0.05$ ) และ 99 % ( $p < 0.01$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย