



บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว (rats) สายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 300 - 350 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลาษา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

2. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

- อ่างเลี้ยงเนื้อเยื่อ (organ bath) แบบ Double-walled Harvard Type
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ DT - Thermostat ของ Heto
- เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผล ไมโครคอมพิวเตอร์ Macintosh® รุ่น LC 475
- เครื่องแปลงสัญญาณ MacLab / 4e™
- เครื่องปรับแต่งสัญญาณ MacLab™ Bridge Amp
- ตัวรับสัญญาณ Force Transducer สำหรับ MacLab™
- เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (stimulator) model S 101 และ platinum electrode
- เครื่องมือผ่าตัด
- microsyringes ขนาดต่างๆ

3. สารเคมี

- Capsaicin (8 - methyl - N - vanillyl - 6 - nonenamide) จากบริษัท Sigma Chemical
- Amitriptyline จากบริษัท Sigma Chemical
- Fluoxetine จากบริษัท Biolab
- Kreb's Henseleit Solution (KHS) ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

ส่วนประกอบ =	ปริมาณ (กรัม / ลิตร)	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)
NaCl	6.92	118
KCl	0.35	4.69
MgSO ₄	0.15	0.60
KH ₂ PO ₄	0.16	1.17
NaHCO ₃	2.10	25.00
CaCl ₂	0.28	2.50
Glucose	2.00	11.10

- Carbogen Gas (O₂ 95% + CO₂ 5%) จากบริษัท TIG

4. วิธีการทำวิจัย

4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนของหนูขาว

ฆ่าหนูด้วยการตีคอกให้กระดูกต้นคอกหลุดเพื่อทำให้ spinal cord ช่วงคอขาดออกจากกัน (spinal dislocation) จากนั้นรีบตัดหัวใจออกจากตัวหนูแล้วนำมาตัดแยกหัวใจห้องบนออกจากหัวใจห้องล่าง รวมทั้งตัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้มากที่สุด จากนั้นทำการแยกหัวใจห้องบนซ้ายและขวาออกจากกัน และจะสังเกตเห็นว่าเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวายังมีการบีบตัวเป็นจังหวะสม่ำเสมอ

ส่วนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายจะไม่มีกรบีบตัว ซึ่งทั้งหมดนี้ต้องทำในสารละลาย KHS ที่ผ่านด้วยก๊าซ Carbogen ตลอดเวลา จากนั้นนำไปแยกแวนใน organ bath ที่บรรจุ KHS 20 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านก๊าซ carbogen ตลอดเวลา และควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4 และ 5) โดยมีการแยกแวนดังนี้

ก. การแวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวา

- ผูกปลายเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาทั้งสองด้านด้วยด้าย โดยให้มีทิศทางตามแนวการบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจ

- ปลายข้างหนึ่งผูกเป็นห่วงขนาดพอควร นำลงไปเกี่ยวกับตะขอกที่กั้นของ organ bath ด้านใน

- ปลายอีกข้างหนึ่งผูกกับ force transducer

- ปรับให้เนื้อเยื่อหัวใจมีความตึงตัว (tension) พอเหมาะ ซึ่งเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวานี้ใช้ศึกษาอัตราการเต้นของหัวใจ โดยมีหน่วยของการวัดเป็นครั้งต่อนาที (beat per minute ; BPM)

ข. การแวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย

- ทำการผูกปลายของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายด้านหนึ่งด้วยด้าย แล้วนำไปผูกกับ force transducer

- ปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย เกี่ยวด้วยแท่ง platinum electrode ตามแนวการบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจ และนำลงไปใน organ bath อีกอันหนึ่ง

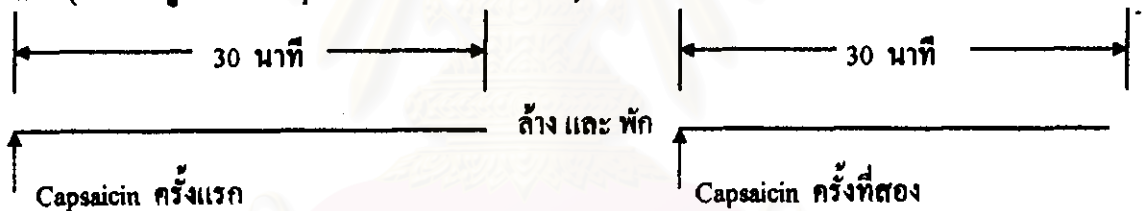
- ทำการต่อแท่ง platinum electrode กับเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า โดยใช้ขนาดศักดาไฟฟ้า 5 โวลต์ (V.) ช่วงระยะเวลาของการกระตุ้นแต่ละครั้งเท่ากับ 5 มิลลิวินาที (msec) ความถี่ของการ กระตุ้น 250 ครั้งต่อนาที (BPM)

- ปรับให้เนื้อเยื่อหัวใจมีความตึงตัวพอเหมาะ ซึ่งเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายนี้ใช้ศึกษาแรงบีบตัวของหัวใจ โดยมีหน่วยของการวัดความแรงของการบีบตัว (amplitude) เป็นกรัม (grams ; g) เมื่อแวนเนื้อเยื่อหัวใจเรียบร้อยแล้วก่อนทำการทดลองผลของยาทุกครั้ง ต้องปล่อยให้เนื้อเยื่อหัวใจปรับสภาพใน KHS ประมาณ 15 - 20 นาที รอจนกระทั่งการเต้นของหัวใจคงที่

จึงเริ่มทำการทดลอง โดยการบันทึกแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจทั้งก่อนและหลังการให้ยา ทุกครั้ง รวมทั้งสังเกตความผิดปกติที่เกิดขึ้นด้วย

4.2 ศึกษาการออกฤทธิ์ของ Capsaicin ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่แยกจากหนูขาว

ให้ capsaicin ขนาด 5×10^{-6} โมลาร์ (M) บันทึกผลการเต้นของหัวใจทั้งสองข้างก่อนให้ยาและผลหลังจากให้ capsaicin ในนาทิตี่ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 (เป็นการให้ capsaicin ครั้งแรก) จากนั้นล้างเนื้อเยื่อหัวใจโดยการเปลี่ยนถ่ายสารละลาย KHS 3 - 5 ครั้ง และพักเนื้อเยื่อหัวใจไว้ประมาณ 15 - 20 นาที รอให้เนื้อเยื่อหัวใจปรับสภาพกลับสู่ปกติ เมื่อคงที่แล้วจึงทำการให้ capsaicin ขนาด 5×10^{-6} M เช่นกัน บันทึกผลเช่นเดียวกับการให้ capsaicin ครั้งแรก (เป็นข้อมูลการให้ capsaicin ซ้ำเป็นครั้งที่สอง)



4.3 ศึกษาการออกฤทธิ์ของ Amitriptyline ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่แยกจากหนูขาว

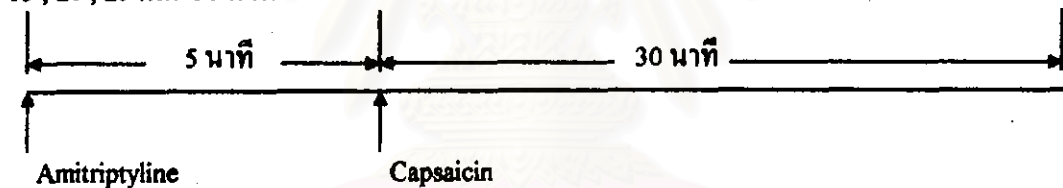
ให้ amitriptyline ขนาด 1.0×10^{-6} M บันทึกผลการทำงานของหัวใจทั้งสองข้างก่อนให้และผลหลังให้ amitriptyline แล้ว 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

4.4 ศึกษาการออกฤทธิ์ของ Fluoxetine ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย ที่แยกจากหนูขาว

ให้ fluoxetine ขนาด 1.0×10^{-6} M บันทึกผลการทำงานของหัวใจทั้งสองข้าง ก่อนให้และผลหลังให้ fluoxetine แล้ว 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

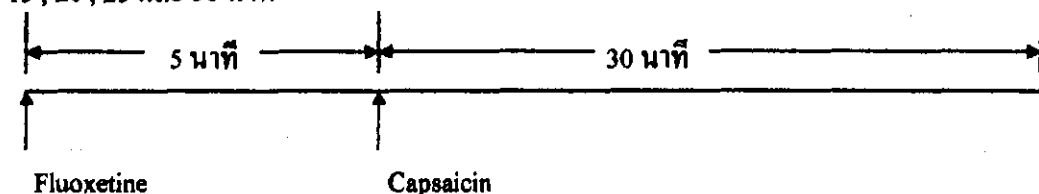
4.5 ศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของ Capsaicin และ Amitriptyline ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย ที่แยกจากหนูขาว

ให้ amitriptyline ขนาด 1.0×10^{-6} M รอ 5 นาที แล้วตามด้วยการให้ capsaicin ขนาด 5×10^{-6} M บันทึกผลก่อนให้ยาใดๆ และผลหลังจากให้ capsaicin แล้ว 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที



4.6 ศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของ Capsaicin และ Fluoxetine ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่แยกจากหนูขาว

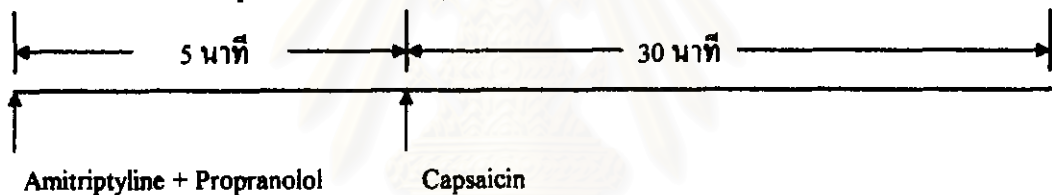
ให้ fluoxetine ขนาด 1.0×10^{-6} M รอ 5 นาที แล้วตามด้วยการให้ capsaicin ขนาด 5×10^{-6} M บันทึกผลก่อนให้ยาใดๆ และผลหลังจากให้ capsaicin แล้ว 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที



4.7 การศึกษาผลของ Propranolol ต่อการออกฤทธิ์ของ Capsaicin ร่วมกับ Amitriptyline และ Capsaicin ร่วมกับ Fluoxetine ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่แยกจากหนูขาว

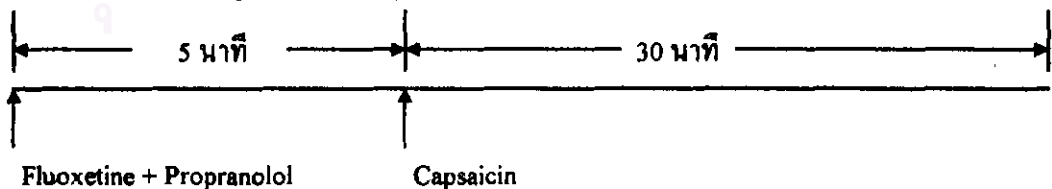
4.7.1 การศึกษาผลของ Propranolol ต่อการออกฤทธิ์ร่วมกันของ Capsaicin และ Amitriptyline

= ให้ amitriptyline ขนาด 1.0×10^{-6} M พร้อมกับ propranolol ขนาด 2.0×10^{-6} M รอ 5 นาที แล้วตามด้วยการให้ capsaicin ขนาด 5×10^{-6} M บันทึกผลก่อนให้ยาใดๆ และผลหลังจากให้ capsaicin แล้ว 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที



4.7.2 การศึกษาผลของ Propranolol ต่อการออกฤทธิ์ร่วมกันของ Capsaicin และ Fluoxetine

ให้ fluoxetine ขนาด 1.0×10^{-6} M พร้อมกับ propranolol ขนาด 2.0×10^{-6} M รอ 5 นาที แล้วตามด้วยการให้ capsaicin ขนาด 5×10^{-6} M บันทึกผลก่อนให้ยาใดๆ และผลหลังจากให้ capsaicin แล้ว 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

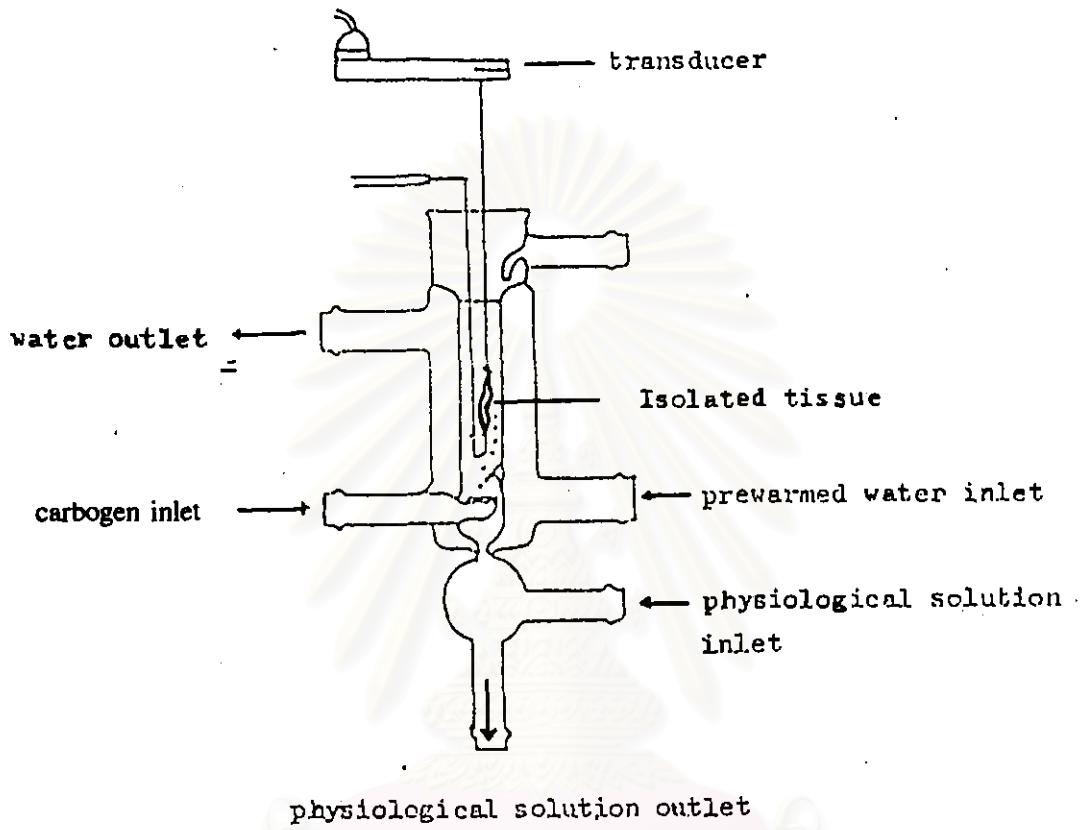


5. การวิเคราะห์ข้อมูล

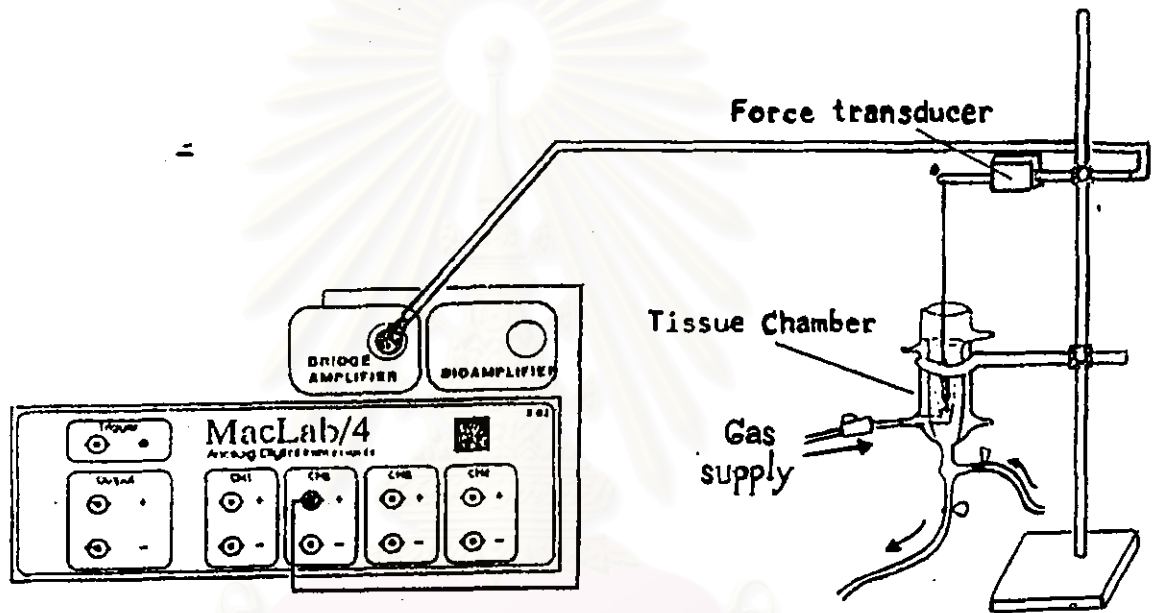
ในแต่ละการศึกษาจะใช้จำนวนสัตว์ทดลองไม่น้อยกว่า 5 ตัว ($n \geq 5$) ผลการทดลองรายงานในรูปของร้อยละ (% contraction) ของอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายของสัตว์ทดลอง โดยกำหนดให้ค่าที่วัดได้ก่อนการให้ยาใดๆเป็น 100 % และผลการทดลองที่ได้จะคิดเป็นร้อยละของผลที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงหลังจากให้ยาในช่วงเวลาต่างๆ

เขียนกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยเลขคณิตของข้อมูล (\bar{X}) หรือ % contraction \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean; SEM) กับเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ซึ่งเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลควบคุมและข้อมูลทดลองโดยใช้ Student's paired t-test โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รูปที่ 4 แสดงการแขวนเนื้อเยื่อหัวใจใน organ bath



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 แสดงการจัดอุปกรณ์ในการทดลอง