บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. วัสดุ สัตว์ทดลอง และเครื่องมือ

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารเคมีที่ใช้ศึกษาผลหัวใจ

cadmium chloride เตรียมจาก $CdCl_2 \cdot 2^1/2\ H_2O$ ของ BDH

norepinephrine เตรียมจาก (-)- Arterenol bitartrate salt ของ Sigma

epinephrine เตรียมจาก Adrenaline injection ของ Liwinner Pharmaceutical

isoproterenal เตรียมจาก Isoproterenol hydrochloride ของ Sigma

ouabain เตรียมจาก Ouabain octahydrate ของ Sigma

calcium chloride เตรียมจาก $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ ของ Merck

serotonin เตรียมจาก 5 - Hydroxytryptamine creatinine sulfate complex ของ Sigma

cysteine เตรียมจาก N - acetyl-L-cysteine ของ Sigma

dithiothreitol เตรียมจาก DL-Dithiothreitol ของ Sigma

dibutyryl c-AMP เตรียมจาก $N^{6'}$ 2'-O-Dibutyryladenosine 3': 5' Cyclic Monophosphate sodium salt ของ Sigma

amrinone เตรียมจาก Amrinone lactate injection ภายใต้ชื่อการค้า Inocor ของ Winthrop

tyramine เตรียมจาก Tyramine hydrochloride ของ Sigma

reserpine เตรียมจาก Reserpine crystalline ของ Sigma

caffeine เตรียมจาก Caffeine anhydrous ของ Sigma

1.1.2 สารละลายเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวใจ

สารละลาย Ringer Locke เตรียมจากส่วนผสมของ NaCl, KCl, $NaHCO_3$, $CaCl_2$ และ D-glucose ใช้น้ำกลั่น 3 ครั้งเป็นตัวทำละลาย ให้ 100 % Oxygen gas (จาก TIG Trading) แก่สารละลายตลอดระยะเวลาทำการทดลอง

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ Physiological solutions

สารเคมี	ความเข้มข้น (mmole/litre)	
	Ringer Locke solution	Calcium-free EGTA Ringer Locke solution
NaCl	154	154
KCl	5.6	5.6
$CaCl_2$	7.9	–
$NaHCO_3$	5.9	5.9
D-glucose	5.5	5.5
EGTA	–	0.1

1.2 สัตว์ทดลอง

1.2.1 หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar เพศผู้ ขนาดน้ำหนัก 200-250 กรัมจากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

1.2.2 หนูตะเภา (guinea pig) เพศผู้ ขนาดน้ำหนัก 300-400 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงสัตว์

1.3 เครื่องมือ

Organ bath chambers ซึ่งประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในจุ 25 มิลลิลิตร เป็นส่วนที่ใช้บรรจุสารละลาย และอวัยวะที่แยกออกมาจากสัตว์ทดลอง ส่วนชั้นนอกสำหรับให้มีการไหลเวียนของน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อจะควบคุมอุณหภูมิของสารละลายใน chamber ชั้นใน

Thermoregulating water pump สำหรับควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ไหลเวียนในชั้นนอกของ Organ bath chambers และอุณหภูมิของสารละลายใน chamber ชั้นใน

Washington 400 MD 2c Oscillograph จาก Bioscience ประเทศอังกฤษ

Isometric force displacement transducer

Stimulator s 101 A และ platinum electrode

2. วิธีทำการวิจัย

2.1 การเตรียมหัวใจห้องบนขวา และห้องบนซ้ายของหนูขาว

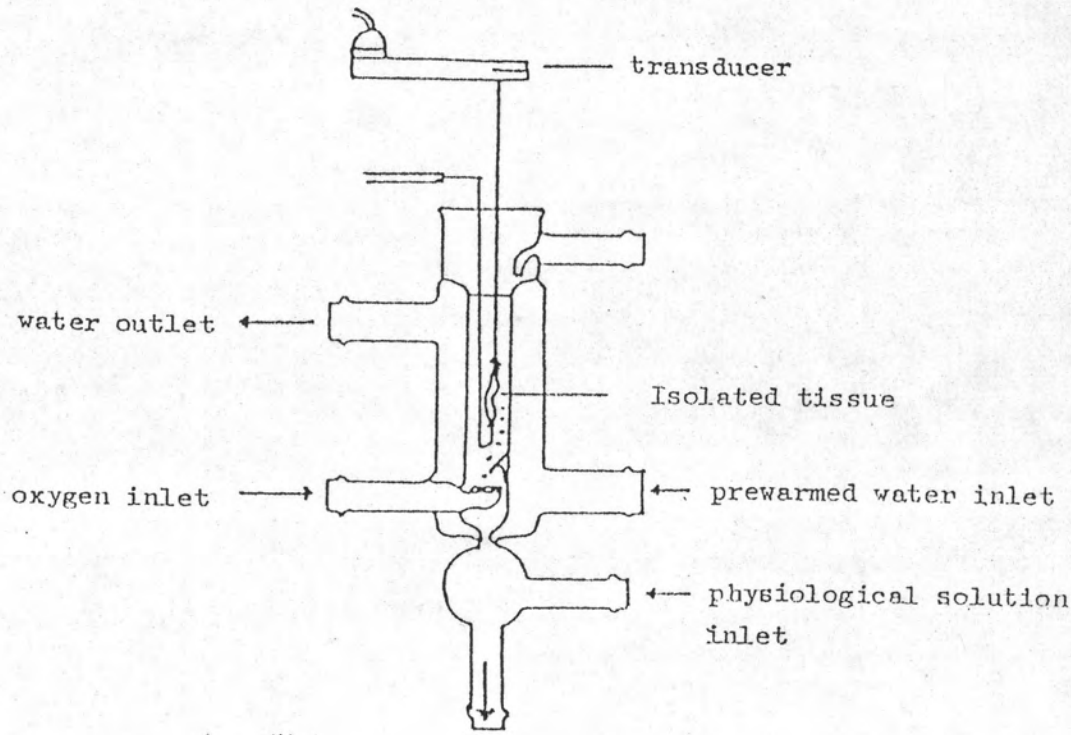
ฆ่าหนูขาวโดยการดึงบริเวณรอยต่อระหว่างคอ และส่วนลำตัว ตัดส่วนหัวออกเพื่อไม่ให้เลือดคั่ง รีบเปิดหน้าอกหนูทันที แยกหัวใจมาใส่ใน petri-dish ซึ่งบรรจุสารละลาย

Ringer Locke และมี gas oxygen ผ่านตลอดเวลา ค่อย ๆ ตัดแยกเอากล้ามเนื้อหัวใจส่วน ventricle และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ออกให้หมด เหลือเพียงหัวใจห้องบน จากนั้นจึงแยกหัวใจห้องบนด้านซ้าย และขวาออกจากกัน

ผูกปลายสองข้างของหัวใจด้านบนขวาด้วยด้าย เกี่ยวปลายด้ายข้างหนึ่งเข้ากับปลายเส้นข้างหนึ่งของแผ่นพลาสติกรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดกว้าง 0.8 เซนติเมตร ยาว 7 เซนติเมตร ซึ่งงอเป็นรูปตัวแอล (L) จากนั้นย้ายชิ้นหัวใจ และแผ่นพลาสติกลงใน organ bath ที่มีสารละลาย Ringer Locke อุ่น 37 องศาเซลเซียส และให้ oxygen gas อยู่พร้อมในปริมาณ 20 มิลลิลิตร ยึดแผ่นพลาสติกทางปลายด้านหนึ่งติดกับ organ bath ผูกด้ายจากอีกข้างหนึ่งของชิ้นหัวใจเข้ากับ transducer ปรับให้หัวใจมีความตึงตัว (tension) ประมาณ 1 กรัม หัวใจด้านบนขวานี้ใช้ศึกษาอัตราการเต้นของหัวใจ โดยมีหน่วยของการนับเป็นครั้งต่อนาที

ส่วนหัวใจห้องบนด้านซ้าย ให้ปลายข้างหนึ่งเกี่ยวกับ platinum electrode และผูกปลายอีกด้านหนึ่ง ด้วยด้ายซึ่งผูกติดกับ transducer และจุ่ม platinum electrode พร้อมชิ้นหัวใจลงใน organ bath chamber ซึ่งภายในบรรจุสารละลาย Ringer Locke อุ่น 37 องศาเซลเซียส โดยมี gas oxygen ผ่านตลอดเวลา เช่นเดียวกับหัวใจห้องบนขวา จากนั้นปรับให้หัวใจมีความตึงตัวประมาณ 1 กรัม และกระตุ้นหัวใจห้องบนซ้ายด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 6 โวลท์ ทุก 10 msec ให้หัวใจห้องบนซ้ายบีบตัวด้วยอัตราคงที่ คือ 100 ครั้งต่อนาที หัวใจด้านบนซ้ายนี้ใช้ศึกษาแรงบีบตัวของหัวใจ โดยมีหน่วยการวัดเป็นมิลลิเมตร

ก่อนทำการทดลองผลของยา ต้องแช่หัวใจไว้ในสารละลาย Ringer Locke ประมาณ 45 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย Ringer Locke ทุก 15 นาที รอจนกระทั่งอัตราการเต้น และแรงบีบตัวของหัวใจคงที่ จึงเริ่มทำการทดลอง โดยการบันทึกอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายในสภาวะต่าง ๆ



รูปที่ 1 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลองกับ isolated rat atria

2.2 การเตรียมหัวใจห้องบนขวา และห้องบนซ้ายของหนูตะเภา

เตรียมแบบเดียวกับหนูขาว แต่แตกต่างกันตรงวิธีฆ่า หนูตะเภาฆ่าโดยวิธีสลัดคอ (dislocation)

2.3 ศึกษาผลของแคดเมียมต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาว

ใช้ $CdCl_2$ ขนาดความเข้มข้น 40 µM บันทึกผลก่อนให้ $CdCl_2$ และผลในนาทีที่ 1,3,5,10 และ 15 หลังจากให้ $CdCl_2$ เปรียบเทียบอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย ในสภาวะก่อนและหลังจากได้รับ $CdCl_2$

2.4 ศึกษาผลของสารที่ออกฤทธิ์แก้ไขภาวะที่แคดเมียมลดอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และลดแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาว

หลังจากให้ 40 µM $CdCl_2$ เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว จึงเริ่มให้สารที่ออกฤทธิ์แก้ไขโดยให้ขนาดน้อยที่สุดก่อน บันทึกผลในนาทีที่ 1, 3, 5 หลังจากได้รับสารเหล่านี้ เมื่อครบ 5 นาทีแล้วจึงให้สารในขนาดต่อไป ทำเช่นนี้จนกระทั่งครบทุกขนาดที่ต้องการศึกษาสำหรับสารที่ใช้วิธีการทดลองแบบนี้ได้แก่ norepinephrine, epinephrine, isoproterenol, ouabain, $CaCl_2$, serotonin, cysteine และ dithiothreitol

2.5 ศึกษาผลในการเสริมฤทธิ์กัน ของสารที่มีผลแก้ไขภาวะที่แคดเมียมลดอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และลดแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาว

หลังจากให้ 40 µM $CdCl_2$ เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว จึงให้สารที่ออกฤทธิ์แก้ไข 2 ตัวร่วมกัน โดยขนาดที่ใช้ต้องเลือกมาจากการศึกษาข้อ 2.4 บันทึกผลในนาทีที่ 1, 3, 5 หลังจากได้รับสารเหล่านี้ สำหรับสารที่เลือกใช้ได้แก่ $CaCl_2$ ร่วมกับ dithiothreitol และ isoproterenol ร่วมกับ dithiothreitol

2.6 ศึกษาผลของ dibutyryl c-AMP ในการแก้ไขภาวะที่แคดเมียมลดอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และลดแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาว

หลังจากให้ 40 μM $CdCl_2$ เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว จึงให้ dibutyryl c-AMP ในขนาดความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M หรือ $3x10^{-4}$ M บันทึกผลหลังให้ dibutyryl c-AMP ที่เวลา 1, 4, 6, 11, 16 และ 19 นาที

สำหรับผลการศึกษาของ dibutyryl c-AMP ในการป้องกันผลของ $CdCl_2$ ต้องให้ dibutyryl c-AMP ก่อนเป็นเวลา 30 นาที จึงให้ 40 μM $CdCl_2$ แล้วบันทึกผลตลอดเวลา 15 นาที เปรียบเทียบกับการศึกษาในข้อ 2.3

2.7 ศึกษาผลของ amrinone ในการแก้ไขภาวะที่แคดเมียมลดอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และลดแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาว และหนูตะเภา

การศึกษาในหนูขาว และหนูตะเภาใช้วิธีแบบเดียวกัน โดยหลังจากให้ 40 μM $CdCl_2$ เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว จึงให้ amrinone ในขนาด $1x10^{-5}$ M, $3x10^{-5}$ M และ $1x10^{-4}$ M โดยต้องให้ขนาดแรกเป็นเวลา 10 นาที ก่อนจึงให้ยาในขนาดต่อไป บันทึกผลที่ 1, 3, 5 และ 10 นาที

สำหรับการศึกษาผลของ amrinone ในการป้องกันผลของ $CdCl_2$ ต้องใช้ amrinone ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M ก่อนเป็นเวลา 15 นาที จึงให้ 40 μM $CdCl_2$ แล้ว บันทึกผลตลอดเวลา 15 นาที

2.8 ศึกษาผลของแคดเมียมในภาวะที่ขาดสารสื่อประสาท ของระบบประสาทซิมพาเธติก และแก้ไขโดยใช้ dithiothreitol

2.8.1 ศึกษาโดยใช้ reserpine

ให้หนูขาวได้รับ reserpine ในขนาด 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้องที่เวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง (Hay and Wadsworth, 1983) ซึ่งทำให้เนื้อเยื่ออยู่ในภาวะที่ขาดสารสื่อประสาทของระบบประสาทซิมพาเธติก หลังจากนั้นฆ่าหนูขาว แยกหัวใจออกมาตามวิธีการในข้อ 2.1 ทดสอบด้วย tyramine เพื่อยืนยันว่าขาดสารสื่อประสาทของระบบประสาทซิมพาเธติกจริง ใช้ $CdCl_2$ ขนาดความเข้มข้น 40 uM บันทึกผลก่อนให้ $CdCl_2$ และผลในนาทีที่ 1, 3, 5, 10 และ 15 หลังจากให้ $CdCl_2$ เปรียบเทียบอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย ในสภาวะก่อนและหลังจากได้รับ $CdCl_2$ รวมทั้งเปรียบเทียบความแตกต่างกับหนูขาวปกติ หลังจากนั้นใช้ dithiothreitol แก้ไขผลของ $CdCl_2$ โดยให้ในขนาดน้อยที่สุดก่อน บันทึกผลในนาทีที่ 1, 3, 5 หลังจากได้รับสารนี้ เมื่อครบ 5 นาทีแล้ว จึงให้สารในขนาดต่อไป เปรียบเทียบผลการแก้ไขกับหนูขาวปกติ

2.8.2 ศึกษาโดยใช้ Tyramine

หลังจากเตรียมหัวใจตามวิธีการในข้อ 2.1แล้ว ใช้ Tyramine ในขนาด $1x10^{-3}$ M ใส่ลงใน organ bath chamber โดยใส่ซ้ำจนเกิดภาวะ tachyphylaxis บันทึกผลก่อนให้ Tyramine และเมื่อเกิด tachyphylaxis แล้ว หลังจากนั้นศึกษา ผลของแคดเมียมตามวิธีการในข้อ 2.3 เปรียบเทียบผลที่ได้กับหนูปกติ หลังจากนั้นศึกษา ผลของ dithiothretol ตามวิธีการในข้อ 2.8.1 เปรียบเทียบผลที่ได้กับหนูปกติ

2.9 ศึกษาผลของแคดเมียมต่อการหลั่งของแคลเซียมจาก sacroplasmic reticulum ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาว ซึ่งถูกกระตุ้นโดย caffeine

หลังจากเตรียมหัวใจห้องบนซ้ายตามวิธีในข้อ 2.1 แล้ว หยุดการกระตุ้นหัวใจและเปลี่ยนสารละลายเป็น Calcium-free EGTA Ringer Locke solution ใช้ caffeine ขนาดความเข้มข้น 50 mM กระตุ้นให้หัวใจเกิดการหดเกร็ง (contracture) บันทึกผลเมื่อการหดเกร็งเกิดเต็มที่และคงตัวได้ระยะหนึ่ง

สำหรับการศึกษาผลของแคดเมียม นำหัวใจอันเดิมมาแช่ในสารละลาย Ringer Locke จนหัวใจมีแรงบีบตัวเหมือนเดิม ใช้ 40 μM $CdCl_2$ ใส่ลงใน organ bath chamber รอจนครบเวลา 15 นาที จึงเปลี่ยนสารละลายเป็น Calcium-free EGTA Ringer Locke solution ที่มี 40 μM $CdCl_2$ ผสมอยู่ด้วย ใช้ caffeine ขนาดความเข้มข้น 50 mM กระตุ้นให้หัวใจเกิดการหดเกร็ง บันทึกผลเมื่อการหดเกร็งเกิดเต็มที่ และคงตัวได้ระยะหนึ่ง เปรียบเทียบผลการหดเกร็งในภาวะที่มีและไม่มีแคดเมียม

3. การประเมินผลการทดลอง

ประเมินผลของหัวใจห้องบนขวา โดยการนับอัตราการเต้นของหัวใจเป็นจำนวนครั้งต่อนาที แล้วคำนวณเป็นร้อยละเปรียบเทียบกันระหว่าง สภาวะก่อนได้รับยา กับสภาวะหลังจากได้รับยา โดยให้การเต้นของหัวใจในสภาวะปกติก่อนได้รับยา (control) มีค่าเป็น 100 และคิดอัตราการเต้นของหัวใจในสภาวะหลังจากได้รับยาต่าง ๆ เป็นร้อยละของอัตราการเต้นของหัวใจในสภาวะปกติ (% control)

สำหรับหัวใจห้องบนซ้าย ประเมินโดยวัดขนาดแรงบีบตัวของหัวใจเป็นมิลลิเมตรแล้วเปรียบเทียบกัน โดยคิดแรงบีบตัวของหัวใจในสภาวะหลังจากได้รับยาเป็นร้อยละของแรงบีบตัวของหัวใจในสภาวะปกติก่อนได้รับยา

ในส่วนการแก้ไขผลของแคดเมียม ให้นำค่าร้อยละที่คำนวณได้ในครั้งแรกมาหักลบกันระหว่างร้อยละหลังจากสารแก้ไขออกฤทธิ์เต็มที่แล้ว และร้อยละหลังจากได้รับ 40 μM $CdCl_2$ ครบ 15 นาที แล้วรายงานเป็น ร้อยละของการเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ [% increase in rate (% control)] สำหรับหัวใจห้องบนขวา และร้อยละของการเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจ [% increase in force (% control)] สำหรับหัวใจห้องบนซ้าย

นำผลที่ได้มาเขียนกราฟ แสดงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับยา

018082 i 14 5 ส 8987

สำหรับการศึกษาในข้อ 2.9 ให้ผลการหดเกร็งในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียมมีค่าเป็น 100 ส่วนผลการหดเกร็งในสภาวะที่มีแคดเมียม มีค่าเป็นร้อยละของสภาวะที่ไม่มีแคดเมียม

ทดสอบความแตกต่างของอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายก่อน และหลังได้รับสารแก้ไขผลของแคดเมียม รวมทั้งทดสอบความแตกต่างในผลของแคดเมียมระหว่างกลุ่มปกติ กับกลุ่มที่ได้รับ reserpine, tyramine, amrinone และ dibutyryl c-AMP ก่อนได้รับ แคดเมียม โดยวิธีทางสถิติ student's t-test ซึ่ง พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P<0.05$)