บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

ก. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar เพศผู้ ขนาดน้ำหนัก 300-350 กรัม

หนูตะเภา (guinea pig) เพศผู้ ขนาดน้ำหนัก 300-400 กรัม

เป็นสัตว์ทดลองจากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป และน้ำประปากรุงเทพฯ

2. สารเคมี

2.1) สารละลายเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวใจ (Perfusion medium)

สารละลาย Locke ซึ่งใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกมาจากหนูขาวและหนูตะเภา มีส่วนประกอบดังนี้ NaCl 9.20 กรัม KCL 0.42 กรัม $CaCl_2$ 0.23 กรัม , $NaHCO_3$ 0.15 กรัม , Glucose 1.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่นสามครั้ง โดยมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ให้ 100% Oxygen Gas (จาก TIG Trading) แก่สารละลาย Locke ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง

2.2) สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาผลต่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกออกมาจากหนูขาวและหนูตะเภา

- แคปไซซิน (trans - 8 - methyl - N - vanillyl - 6 - nonenamide) (Capsaicin) จาก Sigma Chemical Co. แคปไซซินละลายใน absolute ethanol

- อ้วเบน (Ouabain octahydrate) จาก Sigma Chemical Co. อ้วเบนละลายในน้ำกลั่น

3. เครื่องมือวิจัย

3.1) Washington 400 MD 2C Oscillograph จาก Bloscience ประเทศอังกฤษ

3.2) Washington transducer type D

3.3) Stimulator S 101A และ platinum electrode

3.4) Thermo Bath model SCBI

3.5) Isolated Organ Bath double-walled type

ซึ่งส่วนชั้นในใช้บรรจุสารละลายเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปริมาตร 25 มล. และอวัยวะที่แยกออกมาจากสัตว์ทดลอง ส่วนชั้นนอกจะเป็นส่วนที่มีการหมุนเวียนของน้ำอุ่นจากเครื่อง Thermo bath ซึ่งจะทำให้สารละลายที่ส่วนชั้นในมีอุณหภูมิประมาณ 37 ° ซ ตลอดการทดลอง

3.6) เครื่องมือผ่าตัด ด้าย ปากคีบ จานแก้ว petri dish

3.7) Microsyringe ขนาดต่างๆ

ข. <u>วิธีการทำวิจัย</u>

1. การแยกเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายออกจากตัวสัตว์ทดลอง

ทำให้สัตว์ทดลองสลบ โดยการตีบริเวณข้อต่อคอ แล้วรีบเจาะคอโดยใช้กรรไกรปลายแหลมเพื่อไล่เลือดออกจากหัวใจ (ให้ห้อยหัวสัตว์ทดลองแล้วเปิดน้ำให้ไหลผ่านรอยเจาะ) จากนั้นทำการเปิดช่องอกตัดเอาหัวใจสัตว์ทดลองออกมาแช่ในสารละลาย Locke ล้างไล่เลือดออกจากหัวใจ แล้วย้ายหัวใจสัตว์ทดลองมาแช่ในสารละลาย Locke ซึ่งมี 100% Oxygen Gas ผ่านตลอด รีบทำการตัดแยกเอาแต่เนื้อเยื่อหัวใจห้องบน (atrias) ทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อโดยเจาะเส้นเลือด ไขมัน และพวกเยื่อต่างๆที่อยู่รอบนอกออกให้หมด ในระหว่างการทำจะพบว่าเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนยังมีการบีบตัวเป็นจังหวะสม่ำเสมอ จากนั้นทำการแยกเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาออกจากห้องบนซ้าย ซึ่งจะสังเกตุได้ว่าเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวายังมีการบีบตัวเป็นจังหวะสม่ำเสมอ ส่วนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายจะไม่มีการบีบตัว

2. การเกี่ยวเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกมาจากสัตว์ทดลองเข้ากับเครื่องวัด

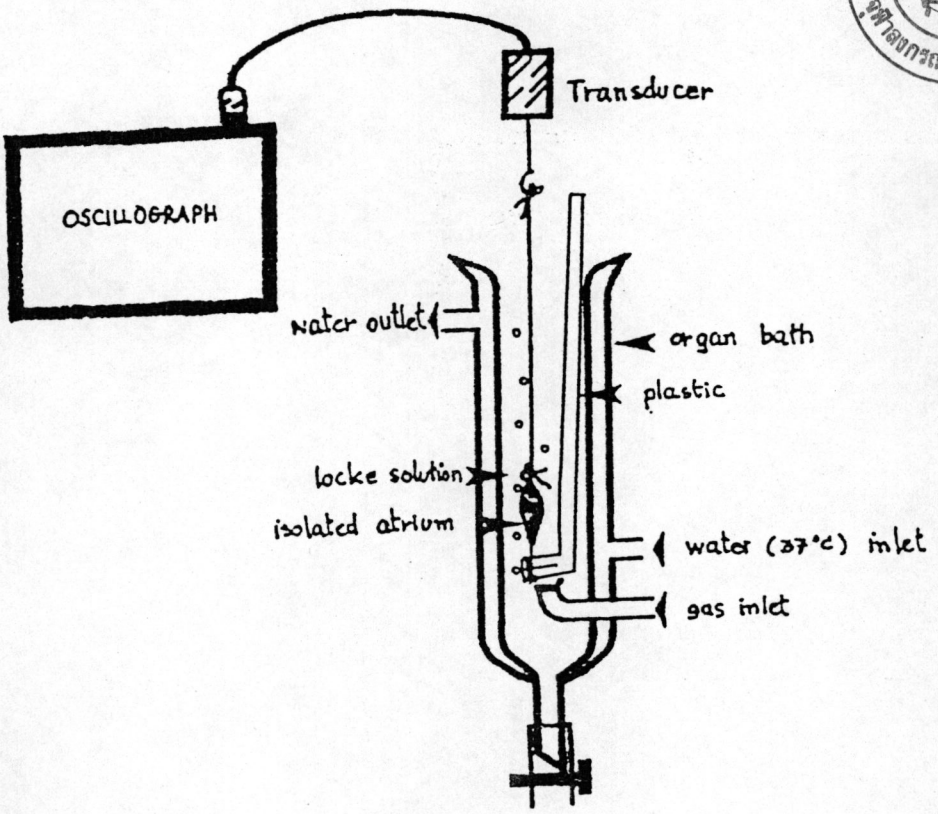
2.1) การเกี่ยวเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาเข้ากับเครื่องวัด

- ทำการผูกปลายเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาทั้ง 2 ด้าน โดยให้มีทิศทางตามแนวแรงบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจ

- นำปลายด้ายข้างหนึ่งเกี่ยวกับแผ่นพลาสติกขนาด 0.8 ซม. x 7 ซม. ซึ่งงอเป็นรูปตัวแอล (L) ตรงฐานตัวแอลใช้เป็นแกนยึด จากนั้นนำแผ่นพลาสติกที่มีเนื้อเยื่อหัวใจเกี่ยวไว้แล้ว ใส่ลงใน organ bath ที่มีสารละลาย Locke 25 มล. อุณหภูมิ 37 °ซ. และให้ Oxygen gas ตลอด แล้วยึดแผ่นพลาสติกติดกับตัว Organ bath นำปลายด้ายอีกข้างหนึ่งผูกกับแขนของ transducer ของเครื่องวัด (รูป ค.)

- ปรับให้เนื้อเยื่อหัวใจมีความตึงตัว (tension) พอเหมาะ ซึ่งเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวานี้ใช้ศึกษาอัตราการเต้นของหัวใจ โดยมีหน่วยของการวัดเป็นครั้งต่อนาที

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูป ค อุปกรณ์การวิจัย และวิธีเตรียมการทดลองกับหัวใจห้องบนขวา

2.2) การเกี่ยวเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายเข้ากับเครื่องวัด

- ทำการผูกด้ายกับส่วนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย ซึ่งจะนำไปผูกติดกับแขนของ transducer ของเครื่องวัด

- ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย ถูกเกี่ยวด้วยแท่ง Platinum eletrode จากนั้นนำแท่ง platinum eletrode ดังกล่าวใส่ลงใน organ bath อีกอันหนึ่งซึ่งมีสภาพเช่นเดียวกับข้อ 2.1

- ทำการต่อแท่ง platinum eletrode เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้าในขนาดศักดาไฟฟ้า 5 volt มีช่วงระยะของการกระตุ้นทุกๆ 5 msec ปรับให้เนื้อเยื่อหัวใจมีความตึงตัวพอเหมาะประมาณ 1 กรัม ซึ่งเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายนี้ใช้ศึกษาแรงบีบตัวของหัวใจ โดยแรงบีบตัวของหัวใจวัดจากความแรง (amplitude) ของการบีบตัวของกล้ามเนื้อเยื่อหัวใจ มีหน่วยเป็น มิลลิเมตร (มม.) (รูป ง.)

เมื่อทำการเตรียมเนื้อเยื่อหัวใจและเครื่องมือเรียบร้อยแล้ว ให้พักเนื้อเยื่อหัวใจ ซึ่งอยู่ใน organ bath ดังกล่าวข้างต้น ประมาณ 15-20 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อหัวใจได้ปรับสภาพการทำงานให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ หลังจากอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาหรือแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายคงที่ดีแล้ว (วัดและบันทึกค่าไว้ ถือเป็นผลก่อนให้ยาใดๆ) จึงเริ่มให้ยาและบันทึกผลของยาที่มีต่อการทำงานของเนื้อเยื่อ หัวใจดังกล่าว

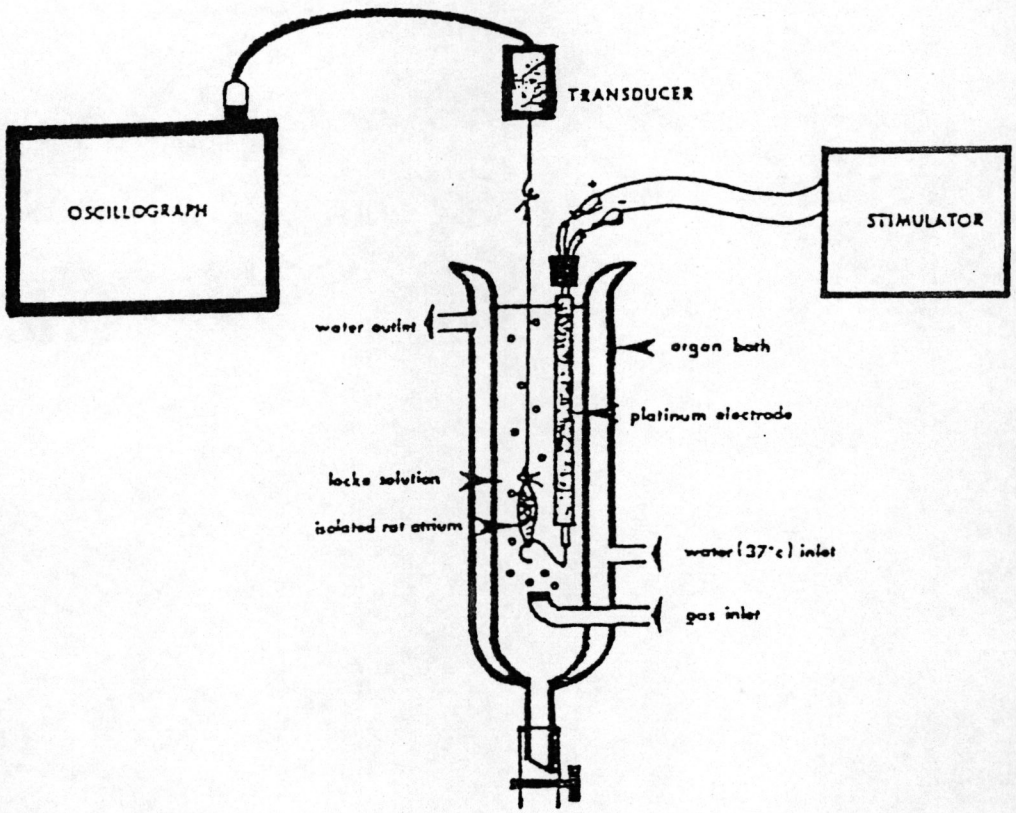
3. การให้ยา

ใช้เข็ม microsyringe ในการทดลองให้ยาในรูปสารละลายแก่เนื้อเยื่อหัวใจ

3.1) การศึกษาฤทธิ์ของแคปไซซิน อัวเบน ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่แยกมาจากหนูขาว

A. การให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก และการให้แคปไซซินซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม

บันทึกผลของการให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก ต่ออัตราการเต้นของหัวใจขห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายในสัตว์ทดลองตัวเดียวกัน โดยบันทึกผลก่อนให้แคปไซซิน และผลหลังจากให้แคปไซซินในนาทีที่ 1,3,5,10,15,20,25 และ 30 (เป็นข้อมูลของการให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก) ต่อจากนั้นล้างเนื้อเยื่อหัวใจและถ่ายเปลี่ยนสารละลาย Locke 2-3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย Locke 25 มล. พักเนื้อเยื่อหัวใจไว้ประมาณ 20 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อหัวใจปรับสภาพการทำงานกลับสู่ปกติ เมื่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายคงที่ดีแล้ว จึงเริ่มทดลองและบันทึกผลของการ



รูป ง อุปกรณ์การวิจัย และวิธีเตรียมการทดลองกับหัวใจด้านบนซ้าย

ให้แคปไซซินซ้ำอีกครั้งที่อสง โดยบันทึกผลเช่นเดียวกับในครั้งแรก (เป็นข้อมูลของการให้แคปไซ-ซินซ้ำในครั้งที่สอง)

B. การให้อัวเบนอย่างดียวในครั้งแรก และการให้อัวเบนซ้ำอีกครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชั้นเดิม

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับข้อ A.แต่เปลี่ยนเป็นให้อัวเบนแทน

C. การให้ร่วมกันโดยที่ให้แคปไซซินก่อน แล้วตามด้วยอัวเบนร่วมร่วมกันในครั้งแรก และการให้แคปไซซินร่วมกับอัวเบนอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชั้นเดิม (แคป-ไซซิน+อัวเบน)

ทำการทดลองในทำนองเดียวกับข้างต้น โดยบันทึกผลอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายก่อนให้ยาใดๆ และผลหลังจากให้แคปไซซินร่วมกับอัวเบน (โดยที่ให้แคปไซซินไปก่อน 1 นาที แล้วตามด้วยให้อัวเบน) วัดค่าในนาทีที่ 1,3,5,10,15,20,25 และ 30 (เป็นข้อมูลของการให้แคปไซซินร่วมกับอัวเบนในครั้งแรก ต่อจากนั้นล้างเนื้อเยื่อหัวใจและถ่ายเปลี่ยนสารละลาย Locke 2-3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย Locke 25 มล. พักเนื้อเยื่อหัวใจไว้ประมาณ 20 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อหัวใจปรับสภาพการทำงานกลับสู่ปกติ เมื่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายคงที่ดีแล้ว จึงเริ่มทดลองและบันทึกผลของการให้แคปไซซินร่วมกับอัวเบนซ้ำอีกครั้งที่สอง โดยบันทึกผลเช่นเดียวกับในครั้งแรก (เป็นข้อมูลของการให้แคปไซซินร่วมกับอัวเบนในครั้งที่สอง)

D. การให้ร่วมกันโดยที่ให้อัวเบนก่อนแล้วตามด้วยแคปไซซินร่วม-กันในครั้งแรกและการให้อัวเบนร่วมกับแคปไซซินซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชั้นเดิม (อัวเบน+แคปไซซิน)

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับข้อ C.

E. การให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก และทำซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองโดยการให้แคปไซซินก่อนแล้วตามด้วยอัวเบนร่วมกันในเนื้อเยื่อชั้นเดิม

บันทึกผลอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา และแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายก่อนให้แคปไซซิน และผลหลังจากให้แคปไซซินในนาทีที่ 1,3,5,10,15,20 25 และ 30 (เป็นข้อมูลของการให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก)ต่อจากนั้นล้างเนื้อเยื่อหัวใจและถ่ายเปลี่ยนสารละลาย Locke 2-3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย Locke 25 มล. พักเนื้อเยื่อหัวใจไว้ประมาณ 20 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อหัวใจปรับสภาพการทำงานกลับสู่ปกติ เมื่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายคงที่ดีแล้ว จึงเริ่มทดลองและบันทึกผล

การทำซ้ำในครั้งที่สองโดยที่ให้แคปไซซินไปก่อน 1 นาทีแล้วตามอัวเบน (แคปไซซิน+อัวเบน) บันทึกผลอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายก่อนให้ยาใดๆ และผลหลังจากให้แคปไซซินร่วมกับอัวเบนในทำนองเดียวกับในครั้งแรก (เป็นข้อมูลของการทำซ้ำในครั้งที่สองด้วยแคปไซซินร่วมกับอัวเบน)

F. การให้อัวเบนอย่างเดียวในครั้งแรก และทำซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองโดยการให้อัวเบนก่อนแล้วตามด้วยแคปไซซินร่วมกันในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับข้อ E.

3.2) การศึกษาฤทธิ์ของแคปไซซิน อัวเบน ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่แยกมาจากหนูตะเภา

A. การให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก และการให้แคปไซซินซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับข้อ 3.1) A.

B. การให้อัวเบนอย่างเดียวในครั้งแรก และการให้อัวเบนซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับข้อ 3.1) B.

C. การให้ร่วมกันโดยที่ให้แคปไซซินก่อนแล้วตามด้วยอัวเบนร่วมกันในครั้งแรก และการให้แคปไซซินร่วมกับอัวเบนซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม (แคปไซซิน+อัวเบน)

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับข้อ 3.1) C.

D. การให้ร่วมกันโดยที่ให้อัวเบนก่อนแล้วตามด้วยแคปไซซินร่วมกันในครั้งแรก และการให้อัวเบนร่วมกับแคปไซซินซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม(อัวเบน+แคปไซซิน)

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับข้อ 3.1) D.

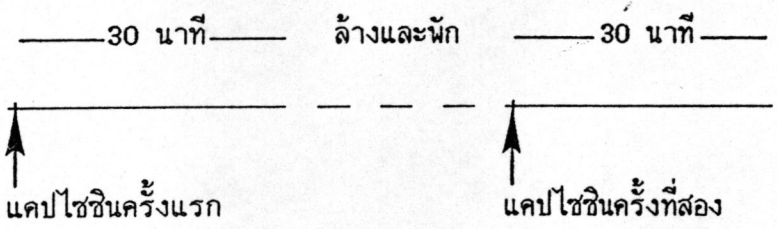
E. การให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก และทำซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองโดยการให้แคปไซซินก่อน แล้วตามด้วยอัวเบนร่วมกันในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับข้อ 3.1) E.

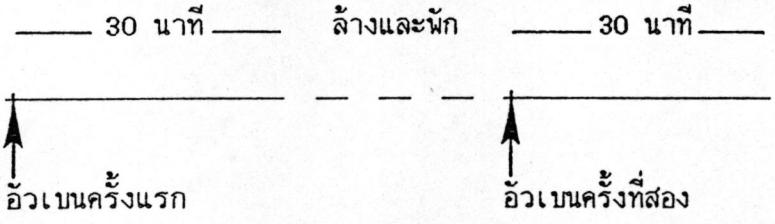
F. การให้อัวเบนอย่างเดียวในครั้งแรก และทำซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองโดยการให้อัวเบนก่อน แล้วตามด้วยแคปไซซินร่วมกันในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม

ทำการทดลองและบันทึกผลในทำนองเดียวกับ 3.1) F.

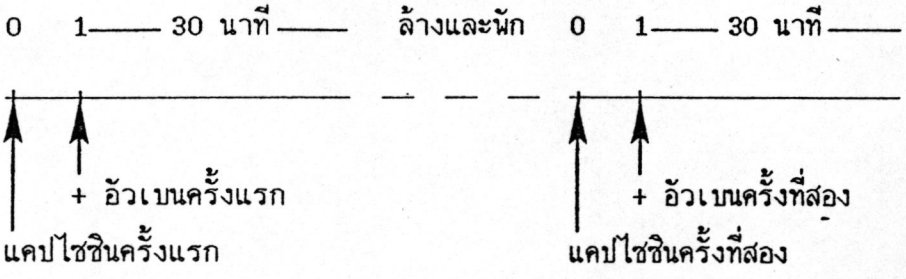
A. การให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก และการให้แคปไซซินซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม



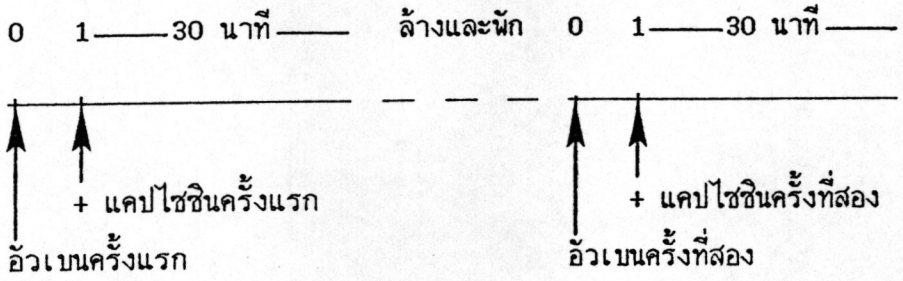
B. การให้อัวเบนอย่างเดียวในครั้งแรก และการให้อัวเบนซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม



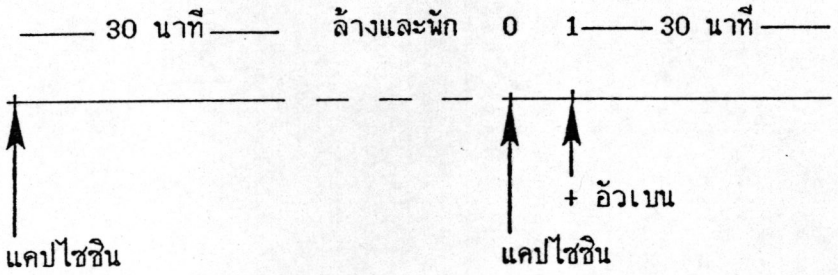
C. การให้ร่วมกันโดยที่ให้แคปไซซินก่อนแล้วตามด้วยอัวเบนร่วมกันในครั้งแรก และการให้แคปไซซินร่วมกับอัวเบนซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม (แคปไซซิน+อัวเบน)



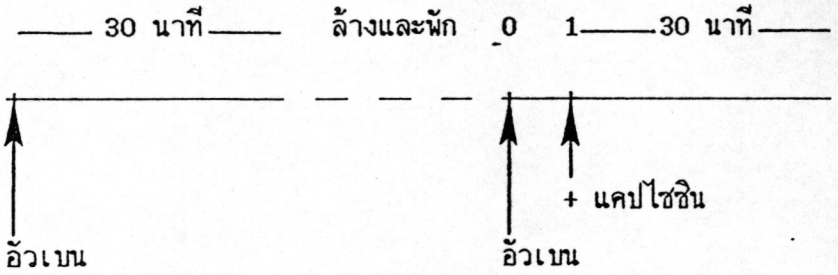
D. การให้ร่วมกันโดยที่ให้อัวเบนก่อนแล้วตามด้วยแคปไซซินร่วมกันในครั้งแรก และการให้อัวเบนร่วมกับแคปไซซินซ้ำอีกในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม (อัวเบน+แคปไซซิน)



E. การให้แคปไซซินอย่างเดียวในครั้งแรก และทำซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองโดยการแคปไซซินก่อนแล้วตามด้วยอัวเบนร่วมกันในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม



F. การให้อัวเบนอย่างเดียวในครั้งแรก และทำซ้ำอีกเป็นครั้งที่สองโดยการให้อัวเบนก่อนแล้วตามด้วยแคปไซซินร่วมกันในเนื้อเยื่อชิ้นเดิม



4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ร้อยละของการเปลี่ยนแปลง (% Δ) ของอัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายของสัตว์ทดลองก่อนให้ยาใดๆ กำหนดให้เป็น 100% อัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากให้ยาแล้ว คิดเป็นร้อยละของการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้น หรือลดลงจากอัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจก่อนให้ยาหรือ 100%

เขียนกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยเลขคณิตของข้อมูล หรือ %Δ (mean value, $\bar{x}$) กับเวลานาทีที่ 1,3,5,10,15,20,25 และ 30 ค่าแตกต่างระหว่าง $\bar{x}$ กับข้อมูล คือค่า SEM (standard error of mean) ใช้วิธี Student's t-test

ซึ่งค่า p (ค่าความเชื่อมั่น) น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีระดับนัยสำคัญทางสถิติ (Statistical significance)