บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารทดลอง

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูแรทพันธุ์ wistar ทั้ง 2 เพศ น้ำหนัก 180 - 250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม จำนวน 150 ตัว

แมวทั้ง 2 เพศ น้ำหนัก 1.5 - 3 กิโลกรัม เลี้ยงในห้องที่มีการระบายอากาศได้สะดวก ให้ข้าวปนกับปลาย่างเป็นอาหาร น้ำดื่มใช้น้ำประปา จำนวน 20 ตัว

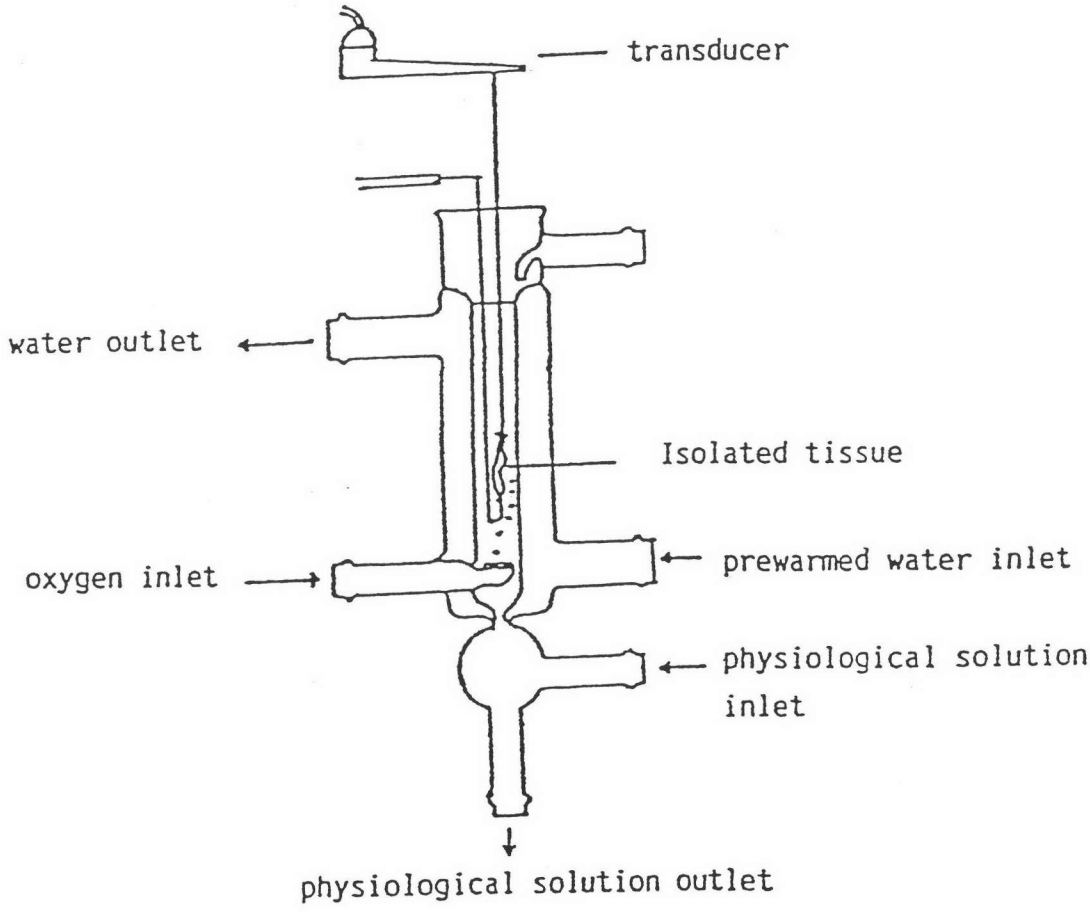
1.2 เครื่องมือ

1.2.1 การศึกษา in vivo ใช้

- Harvard Universal Oscillograph
- Pressure Transducer, Harvard Model

1.2.2 การศึกษา in vitro ใช้

- Organ bath ในการทดลองครั้งนี้ใช้ชนิด double walled harvard type ซึ่งประกอบไปด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในมีความจุ 25 มิลลิลิตร เป็นชั้นที่บรรจุสารละลายที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (physiological solution) ชั้นนอกเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำควบคุมอุณหภูมิ (thermoregulating water pump) ส่งน้ำให้ไหลเข้าออกในชั้นนี้ตลอดเวลา นอกจากนี้ organ bath ยังมีช่องทางเปิดให้อากาศ (ก๊าซออกซิเจน 95%, คาร์บอนไดออกไซด์ 5%) ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นใน (รูปที่ 3)
- Beckman Type RM. Dynograph Recorder
- Isometric Transducer, Beckman Type



รูปที่ 3 Organ Bath

ตารางแสดงส่วนประกอบของสารละลายเครป (Kreb) ใน 1 ลิตร

สารเคมี	กรัม
NaCl	6.92
KCl	0.35
$CaCl_2$	0.28
$MgSO_4$	0.14
$NaHCO_3$	2.09
KH_2PO_4	0.16
Glucose	2.1
Oxygen	95%
Carbondioxide	5%

1.3 สารทดลอง

1.3.1 การสกัดบาราคอล (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2521) นำใบอ่อนและยอดอ่อนสด ๆ ของขี้เหล็ก ซึ่งซื้อจากตลาดศาลาน้ำร้อน กรุงเทพฯ สับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และปั่นให้ละเอียด แล้วนำไปต้มกับ 2% acetic acid นานประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นและกรองเก็บ filtrate ที่ได้ไว้ ส่วนกากที่เหลือนำไปต้มกับ 2% acetic acid อีกครั้งเพื่อสกัดซ้ำ รวบรวม filltrate ทั้งหมดนำมาทำให้เป็นด่างด้วย ammonium hydroxide เข้มข้นให้มี pH 8-9 เสร็จแล้วนำไปสกัดด้วย chloroform จากนั้นนำ chloroform extracted ที่ได้ไปเขย่ากับน้ำแล้วแยกน้ำออก และดูดน้ำที่ตกค้างอยู่ด้วย sodium sulphate anhydrous อีกครั้ง แล้วกรอง จากนั้นนำ chlorofrom extracted ไปทำให้เข้มข้นภายใต้ reduce pressure โดยใช้ rotavapor ให้เหลือปริมาณประมาณ 1 ใน 3 ของ filltrate แล้วนำ solution ที่ได้มาสกัดด้วย 5 % acetic acid แล้วนำ acid extracted ที่ได้ไปค่อย ๆ เติม ammonium hydroxide เข้มข้นทีละหยดเพื่อ neutralize แล้วทำให้เย็นโดยใส่ตู้เย็น จะได้ผลึกสีเหลืองอมเขียว นำมากรองทำให้แห้ง จะได้ crude extracted จากนั้นนำ crude extracted ไปทดสอบสูตรโครงสร้างที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยหา ultraviolet (UV) absorption spectrum,

infrared (IR) absorption spectrum, nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum, mass spectrum

1.3.2 สารเคมีอื่น ๆ

- L-phenylephrine (sigma)
- acetylcholine chloride (sigma)
- atropine sulphate (sigma)
- hexamethonium bromide (sigma)

1.3.3 การให้สารทดลอง

การทดลอง in vivo จะเริ่มการทดลองหลังจากความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจของสัตว์ทดลองที่วัดได้คงที่อยู่นานประมาณ 15 นาที การให้สารทดลองเข้าสู่สัตว์ทดลองในหนูแรทจะให้ผ่านทางหลอดเลือดดำจูกูล่า (jugular vein) ส่วนในแมวจะให้ทางหลอดเลือดดำฟีมอรัล (femoral vein) โดยวิธีการฉีดอย่างช้า ๆ และตามด้วยน้ำเกลือ (normal saline) 0.2 มิลลิลิตรในหนูแรท และ 0.5 มิลลิลิตรในแมว

การทดลอง in vitro จะเริ่มการทดลองหลังจากเนื้อเยื่อถูกปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลองเป็นระยะเวลา 60 นาที จึงเริ่มให้สารทดลองลงใน organ bath โดยใช้ microsyringe ขนาด 1 มิลลิลิตร

2. วิธีการ

2.1 ศึกษาผลของบาราคอลต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแรท

ทำให้สัตว์ทดลองสลบด้วย nembutal 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitonium) หลังจากนั้นทำ tracheostomy เพื่อช่วยในการหายใจ และกำจัดเสมหะที่อุดกั้นทางเดินหายใจ การให้สารทดลองกระทำโดยสอดสายโพลีเอธีลีนเข้าสู่หลอดเลือดดำจูกูล่า และการบันทึกความดันเลือดและอัตราการ

เต้นของหัวใจ กระทำโดยใส่สายโพลีเอธีลีนเข้าสู่หลอดเลือดแดงคารอติด (carotid artery) ซึ่งต่อเข้ากับ pressure transducer, harvard model และบันทึกโดยใช้เครื่อง harvard universal oscillograph

ในการศึกษาผลของบาราคอลต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของบาราคอลในขนาดต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจโดยใช้บาราคอลในขนาด 0.5, 1, 3, 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แล้วบันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ หลังจากให้บาราคอลในขนาดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 20 นาที

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของบาราคอลต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ หลังจากยับยั้งการทำงานของประสาท postganglionic cholinergic ด้วย atropine ให้บาราคอลขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แล้วบันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ เป็นระยะเวลา 20 นาที ต่อมาให้ acetylcholine 1.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แล้วบันทึกการเปลี่ยนความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นให้ atropine 0.3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เพื่อยับยั้งการทำงานของประสาท postganglionic cholinergic บันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของ atropine โดยให้ acetylcholine 1.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมอีกครั้ง ต่อมาอีก 5 นาทีจึงให้บาราคอลขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และบันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ เป็นระยะเวลา 20 นาที เพื่อดูฤทธิ์ของบาราคอลต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดหลังจากระบบประสาท postganglionic cholinergic ถูกยับยั้ง

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของบาราคอลต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ หลังจากยับยั้งการทำงานของแกงเกลียของระบบประสาทออโตโนมิคด้วย hexamethonium bromide ให้บาราคอลขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม บันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจเป็นระยะเวลา 20 นาที ต่อมาให้ hexamethonium bromide 3.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม บันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือด เป็นระยะเวลานาน 3 นาที แล้วให้บาราคอลขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 20 นาที

2.2 ศึกษาผลของบาราคอลต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจในแมว

ทำให้สัตว์ทดลองสลบด้วย nembutal 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง หลังจากสัตว์ทดลองสลบแล้วสอดสายโพลีเอธีลีนเข้าทางหลอดเลือดดำฟีมอรัลเพื่อให้สารทดลอง บันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจทางหลอดเลือดแดงฟีมอรัล โดยใช้ pressure transducer, harvard model ซึ่งต่อกับ harvard universal oscillograph หลังจากนั้นแบ่งกลุ่มและให้ยาเช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.3 ศึกษาผลของบาราคอลต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ทรวงอก (thoracic aorta) ในหนูแรทที่แยกออกมา

ทำให้สัตว์ทดลองสลบด้วยวิธีการดึงคอ จากนั้นผ่าตัดเปิดช่องอกพยายามเลาะตัดหลอดเลือดแดงใหญ่ทรวงอกให้ได้ยาวที่สุด แล้วนำมาใส่ petri disk ที่บรรจุสารละลาย Kreb (ตารางที่ 1) และมีก๊าซออกซิเจน 95% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลา เลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมดแล้วตัดหลอดเลือดแดงในแนวเฉียงให้มีขนาดกว้าง 2-3 มิลลิเมตร ยาว 2 เซนติเมตร จากนั้นใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้างของหลอดเลือด โดยปลายข้างหนึ่งผูกกับแท่งแก้วขนาดเล็ก เพื่อใส่ไปใน organ bath ซึ่งภายในบรรจุสารละลาย Kreb และมีก๊าซออกซิเจน 95% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผ่านตลอดเวลา มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งต่อกับ beckman type RM dynograph record

เพื่อบันทึกการหดตัวของหลอดเลือด หลอดเลือดแดงจะถูกดึงให้ตึงภายใต้แรง 1 กรัม ระหว่างคอยให้เนื้อเยื่อปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลอง เป็นเวลา 60 นาทีจะเปลี่ยนสารละลายทุก 15 นาที ในการทดลองแต่ละครั้งจะทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อนด้วย phenylephrine 10^{-4} โมล และให้ acetylcholine 10^{-4} โมล เพื่อทดสอบความคงอยู่ของ endothelium (Furchgott และ Zawadzdi, 1980) หลังจากนั้นล้างเนื้อเยื่อหลาย ๆ ครั้งด้วยสารละลาย Kreb ให้หลอดเลือดคลายตัวอยู่ระดับเดียวกันก่อนการทดลอง จึงเริ่มการทดลองต่อไป โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของบาราคอลต่อหลอดเลือดแดงทรวงอก ซึ่งอยู่ในสภาวะหดตัว หลังจากหลอดเลือดแดงอยู่ในภาวะที่เหมาะสมกับการทดลอง จะเริ่มการทดลองโดยให้ phenylephrine 10^{-4} โมล เพื่อให้หลอดเลือดหดตัวอีกครั้ง หลังจากนั้น 10 นาที เริ่มให้บาราคอล 3 ขนาดเรียงกัน คือ 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} โมล แต่ละขนาดห่างกัน 5 นาที

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของบาราคอลต่อหลอดเลือดแดงทรวงอก ซึ่งอยู่ในสภาวะหดตัว หลังจากยับยั้งการทำงานของปลายประสาท postganglionic cholinergic ด้วย atropine หลังจากหลอดเลือดแดงอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมกับการทดลอง จะเริ่มการทดลองโดยให้ phenylephrine 10^{-4} โมล เพื่อให้หลอดเลือดหดตัวอีกครั้ง หลังจากนั้น 10 นาทีให้ atropine 10^{-6} โมล เพื่อยับยั้งการทำงานของปลายประสาท postganglionic cholinergic หลังจากนั้น 5 นาที ให้ acetylcholine 10^{-4} โมล เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วย atropine ต่อมาอีก 5 นาทีเริ่มให้บาราคอลเรียงกัน 3 ขนาด คือ 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} โมล แต่ละขนาดห่างกัน 5 นาที

2.4 ศึกษาผลของบาราคอลต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ทรวงอก ที่ไม่มีเยื่อบุ endothelium ในหนูแรทที่แยกออกมา

เตรียมหลอดเลือดแดงเช่นเดียวกับข้อ 2.3 ก่อนนำแท่งแก้วซึ่งมีหลอดเลือดผูกติดอยู่ลง organ bath ใช้ไม้พันสำลีถูผนังด้านในของหลอดเลือดเบา ๆ เพื่อขูดเยื่อบุ endothelium ออกก่อน หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 2.3 และทดสอบความคงอยู่ของเยื่อบุ endothelium (Furchgott และ Zawadzki, 1980) ต่อมาเมื่อหลอดเลือดอยู่

ในสภาวะที่เหมาะสมกับการทดลอง จึงเริ่มทำการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง และทำเช่นเดียวกับข้อ 2.3

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองจะรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard error of mean) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการให้สารทดลองในแต่ละกลุ่มใช้ Student's paired t-test และใช้ unpair t-test เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$