

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย



สัตว์ทดลองที่ใช้ หนูขาว (albino rat), หนูตะเภา (guinea pig), สุนัข

รายการยาที่ใช้ในการวิจัย

1. dl - Isoprenaline
2. 1 - Phenylephrine hydrochloride
3. 1 - Norepinephrine bitartrate
4. dl - Propranolol
5. Phentolamine hydrochloride
6. Metoprolol
7. Atropine sulphate
8. Hexamethonium (C_6)
9. Heparin sodium
10. Pentobarbital sodium injection (Nembutal ของ Abbott)
11. Normal Saline Solution (NSS)
12. Kreb's solution ประกอบด้วย NaCl 5.54, KCl 0.35, $MgSO_4$
.7 H_2O 0.29, $CaCl_2$.2 H_2O 0.28, KH_2PO_4 0.16, $NaHCO_3$ 2.1,
Glucose 2.1 กรัม/ลิตร

เตรียมยาเป็น Stock solution ใน distilled water

ก่อนทำการทดลอง นำ Stock solution มาละลายในสารละลายที่เหมาะสมตามความต้องการใน NSS. หรือ Kreb's solution

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การศึกษาถึงการตอบสนองของ alpha- & beta-adrenergic receptors
ต่อยากระตุ้นที่กล้ามเนื้อหัวใจส่วน atria โดยตรง

1.1 Isolated rat atria

ใช้หนูขาวตัวผู้ น้ำหนักระหว่าง 150-250 กรัม มาหุ้โดยการใช้ไหมโซ่เย็บเย็บเพื่อป้องกันเลือดของยาที่อาจมีฤทธิ์ทำให้หนูมีการตอบสนองของทอยาผิดปกติไป รับประทานออก ตัดเอาเฉพาะหัวใจอย่างรวดเร็ว นำมาแช่ในน้ำยา **Kreb's** ซึ่งทำให้มีอ็อกซิเจน 95 % $O_2 + 5\% CO_2$ ตลอดเวลา แล้วจึงแยกเอาเฉพาะหัวใจส่วน atria ไว้ใช้ surgical silk ผูกหัวใจทั้งสองข้าง นำมาแขวนใน isolated organ bath ซึ่งบรรจุด้วยน้ำยา **Kreb's** 10 c.c และมี 95 % $O_2 + 5\% CO_2$ ผ่านตลอดเวลา อุณหภูมิของ bath ควบคุมให้คงที่ที่ $32 \pm 1^\circ C$ ด้วย Churchill pump บันทึกอัตราการเต้นและแรงบีบตัวของ atria โดยอาศัย Statham Universal Transducer Model UC-2 ซึ่งต่อกับ Strain Gage Coupler Type 9803 ของ Beckman Type R 411 Dynograph Recorder ทำให้ atria ถึงตัว (applied tension) ในขนาด 1 กรัม ทุกครั้งที่ทำการทดลอง และรอให้หัวใจอยู่ในภาวะสมดุลนาน 1 - $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ก่อนเริ่มให้ยา

เมื่อหัวใจอยู่ในภาวะสมดุลแล้ว ให้ยา phenylephrine ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ $10^{-6} M$ ลงไปใน bath โดยตรง ค่อย ๆ เพิ่มขนาดของยา จนกระทั่งได้ถึงขนาดที่กล้ามเนื้อหัวใจบีบตัวแรงที่สุด (ประมาณ $10^{-3} M$) และให้ต่อไปอีก 1 - 2 ความเข้มข้น เพื่อพิสูจน์ว่า กล้ามเนื้อหัวใจจะไม่บีบตัวแรงกว่านี้อีก จึงล้างออก ระวังการเต้นของหัวใจกลับคืนมาสู่ภาวะปกติหรือจนกระทั่งหัวใจอยู่ในภาวะสมดุล จึงให้ยา isoprenaline ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ $10^{-7} - 10^{-4} M$ โดยวิธีเดียวกับที่ให้น้ำยา phenylephrine ล้างและรอให้หัวใจอยู่ในสภาวะสมดุลในน้ำยา **Kreb's**

ต่อมาเติม propranolol ลงในน้ำยา **Kreb's** ที่มีความเข้มข้น $10^{-6} M$ แล้ว atria ในน้ำยาเป็นเวลาประมาณ 30 - 45 นาที แล้วจึงให้ยา phenylephrine และ isoprenaline ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น (Cumulated Dose Response Relationship) ต่อมาเติม propranolol ลงในน้ำยา **Kreb's** ที่มีความเข้มข้นเป็น $10^{-5} M$ และให้ยา phenylephrine และ isoprenaline เพื่อทำ Dose Response Relationship โดยวิธีเดียวกัน นำผลที่ได้ไป plot log dose response curve เพื่อคุณสมบัติของ beta-blocker ตลอดจนศึกษาระบบหัวใจของยา

phenylephrine และ isoprenaline

กอนาทคดองกุงลของ alpha-blocker คอยากระศุน 2 ชนิดเคมโดย
ในน้ำยา Kreb's ที่มี phentolamine 10^{-6} และ 10^{-5} M และ propranolol
และคําเนนการทคดองโดยวิธีเคียวกัน

1.2 Isolated guinea pig atria

ใช้หนูตะเภาทั้งตัวผู้และตัวเมีย น้ำหนักระหว่าง 200 - 350 กรัม รับประทาน
คักเอาหัวใจมาแช่ในน้ำยา Kreb's โดยวิธีที่บ่งไว้ใน 1.1 แยก atria ซ้ายและ
ขวาออกจากกัน นำไปแชวนใน isolated organ bath หัวใจข้างขวาปล่อยให้ตนเอง
ส่วนหัวใจข้างซ้ายกระตุ้นด้วย electrical stimulator ผ่าน silver electrode
ด้วยควมแรงที่เพียงพอให้หัวใจมีแรงบีบตัวโคสม่าเสมอ (ประมาณ 40 Volt, pulse width
0.5 mSec) ในอัตรา 100 ครั้ง/นาที (ใช้ frequency อยู่ระหว่าง 1 - 2 Hz)
คดองการทคดอง บันทึกอัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจ โดยอาศัย Force
Displacement Transducer ตามที่บ่งไว้ใน 1.1 รอให้หัวใจทั้ง 2 ข้างอยู่ในสภาวะ
สมดุล (1 - 1½ ชั่วโมง) จึงเริ่มให้ยา phenylephrine และ isoprenaline
ตามวิธี และ sequence เคียวกับ 1.1 แสดงผลอัตราการเต้นและการบีบตัวของหัวใจ
เป็น Log Dose Response Curve

เปรียบเทียบควมแตกต่างของ response โดยใช้ Student's t
test แบบ paired groups

2. การศึกษาถึง alpha- & beta-adrenergic receptors ที่กล้ามเนื้อ
หัวใจและหลอดเลือดของสุนัข แบบ in vivo

2.1 การศึกษผลของการฉีก alpha- & beta-adrenergic agonists
ต่อ left intraventricular pressure ของสุนัข

ใช้สุนัขตัวผู้ น้ำหนักระหว่าง 8 - 12 กิโลกรัม ทำให้สลบโดยการฉีก
Pentobarbital Sodium 35 mg/kg ทาง intraperitoneal เจาะคอใส่
endotracheal tube เพื่อช่วยการหายใจ ทอม่าสอด polyethylene canula

000529

เขาทาง femoral vein เพื่อศึกษาที่จะทดลอง วัด heparin sodium I/V ขนาด 100 IU/kg เพื่อป้องกันการแข็งตัวของโลหิต แลวางสอด cardiac catheter เข้าทาง left carotid artery ผ่าน mitral valve เขาไปใน left ventricle ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งของ cardiac catheter ต่อกับ pressure transducer ซึ่งต่อกับ Strain Gage Coupler Type 9803 ของ Beckman Type R 411 Dynograph Recorder เพื่อบันทึก intraventricular pressure ของหัวใจ พร้อมทั้งบันทึกอัตราการเต้นของหัวใจด้วย

การทดลองวิธีนี้แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1. ไม่ตัด vagus nerve แต่ให้ hexamethonium (C_6)

ขนาด 2 mg/kg. I/V

กลุ่มที่ 2. ตัด vagus nerve ทั้ง 2 ข้าง เพื่อหลีกเลี่ยง

reflex จาก parasympathetic nerve และในกลุ่มนี้ให้ C_6 2 mg/kg

I/V ด้วย

กลุ่มที่ 3. ไม่ตัด vagus nerve แต่ให้ atropine 10 mg/kg

ในแต่ละกลุ่มทำการทดลองเช่นเดียวกัน หลังจากเตรียมสัตว์ทดลองเรียบร้อยแล้ว บันทึก intraventricular pressure และอัตราการเต้นของหัวใจจนให้ยาประมาณ 15 - 30 นาที ฉีดยา phenylephrine ขนาดต่าง ๆ เข้าทาง femoral vein โดยให้ผ่านเขาทาง femoral canula พร้อมบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของ intraventricular pressure เพื่อหาขนาดที่เหมาะสม (suitable submaximal doses) ที่จะใช้ทดลองต่อไป แลฉีดยา isoprenaline ในตำแหน่งเดียวกับ phenylephrine ซึ่งผลที่ได้ใช้เป็น control หลังจากรอให้หัวใจอยู่ในสภาวะสมควรมแล้ว ให้ยา C_6 2 mg/kg ทาง femoral vein ในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 หลังจากให้ยาแล้วรอนานประมาณ 10 - 15 นาที ส่วนกลุ่มที่ 3 ให้ยา atropine 10 mg/kg ทาง I/V หลังจากให้ยา รอนานประมาณ 45 - 60 นาที แลฉีดยาทั้ง isoprenaline และ phenylephrine ในขนาดที่เหมาะสม พร้อมบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทาง intraventricular pressure ทุกครั้งที่ให้ยา ต่อมาฉีด alpha-blocker

คือ phentolamine ขนาด 1.0 mg/kg i/v คุณสมบัติของ phentolamine 10 - 15 นาที จึงฉีดยาทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าว พร้อมบันทึกผลการเปลี่ยนแปลง ในทำนองเดียวกัน ศึกษาผลของ isoprenaline และ phenylephrine หลังจาก block ด้วย beta₁-blocker คือ metoprolol ขนาด 0.4 mg/kg และ non-specific beta-blocker คือ propranolol ขนาด 0.1 mg/kg ตามลำดับ นำผลที่ได้จากการทดลองมา plot log dose response curve เพื่อคุณสมบัติของ blockers ทาง 1 ศึกษาที่ระดับหัวใจของ ยาทั้ง 2 ชนิด

2.2 การศึกษาผลของสาร alpha- & beta-adrenergic agonists

คือ peripheral resistance โดยวิธี perfused hind limb ของสุนัข

ใช้สุนัขตัวผู้น้ำหนักระหว่าง 8 - 15 กิโลกรัม เตรียมสุนัขเช่นเดียวกับข้อ 2.1 และทำเพิ่มเติมจากนั้น คือ ผูก femoral artery แล้วสอด polyethylene canula เข้าไปใน femoral artery ทางด้านหัวใจ และให้เลือดไหลออกจาก femoral artery ผ่าน Flow Inducer (ที่ rate 1.5) ซึ่งใช้ควบคุม perfusion pressure และ rate ไหลงที่ ตลอดจนการทดลอง เมื่อเลือดผ่าน pump ออกมา มี y-piece แยกออกไปต่อกับ pressure transducer ซึ่งต่อกับ Strain Gage Coupler Type 9803 ของ Beckman Type R 411 Dynograph Recorder เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงของ peripheral pressure ด้านหนึ่ง อีกด้านหนึ่งต่อกับ canula ซึ่งสอดเข้า femoral artery เพื่อส่งเลือดไปเลี้ยงขาหลัง ซึ่งก่อนจะเข้า femoral artery มี three-way กั้นอยู่ เพื่อใช้เป็นเทคนิคยาเข้า intra-arterial ที่ขาของสุนัข

หลังจากเตรียมสัตว์ทดลองเรียบร้อยแล้ว บันทึก peripheral pressure ก่อนให้ยาประมาณ 15 - 30 นาที ฉีดยา atropine 10 mg/kg ซ้ำ ๆ เข้าทาง femoral vein โดยให้ผ่านเข้าทาง femoral canula พร้อมบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของ peripheral pressure หลังจากนั้นประมาณ 45 - 60 นาที จึงฉีด phenylephrine ขนาดต่าง ๆ เข้าทาง intra-arterial พร้อมบันทึกผลการ

เปลี่ยนแปลงเพื่อหาขนาดที่เหมาะสม (suitable submaximal doses) ที่จะนำมาใช้ทดลอง ต่อมาหาขนาดที่เหมาะสมของ norepinephrine และ isoprenaline ตามลำดับ โดยวิธีเดียวกัน เมื่อได้ขนาดที่คงการของยาทั้ง 3 ชนิดแล้ว จึงให้ alpha-blocker คือ phentolamine ขนาด 1 mg/kg ก่อนให้ยากระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ในขนาดที่เลือกสรรแล้ว ต่อมาจึงให้ beta-blocker คือ metoprolol ขนาด 0.4 mg/kg และ non-specific beta-blocker คือ propranolol ขนาด 0.1 mg/kg. ตามลำดับ ก่อนให้ยากระตุ้นทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว นำผลที่ได้มา plot dose response curve