หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

## อุปกรณ์และวิธีการ

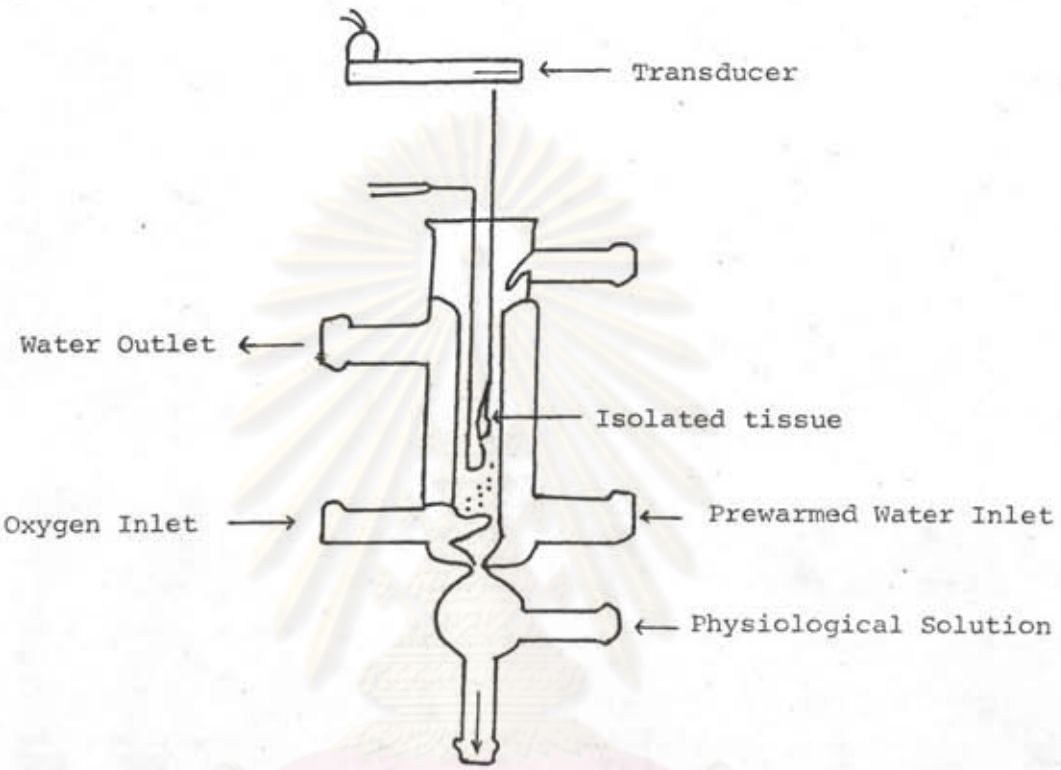
1. สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารทดลอง

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จำนวน 100 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ต.ศาลายา อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม

1.2 เครื่องมือ

Isolated Chamber หรือ Organ Bath: ในการทดลองครั้งนี้ใช้ชนิด Double Walled Harvard Type ซึ่งจะประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในมีความจุ 25 มิลลิลิตร เป็นชั้นที่บรรจุสารละลายที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (Physiological Solution) ชั้นนอกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยจะมีน้ำอุ่นจากเครื่องสูบน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Thermoregulating Water Pump) ส่งน้ำให้ไหลเข้าออกในชั้นนี้ นอกจากนี้ Organ bath ยังมีช่องทางเปิดให้อากาศ (ก๊าซออกซิเจน 100%) ผ่านเข้าสู่หลอดแก้วชั้นใน (ดังภาพที่ 6)




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 6 แสดง Organ Bath หรือ Isolated Chamber

Isometric force displacement transducer (Grass F T 03c)

Sekonic recorder ต่อกับ Harvard transducer amplifier

Churchill thermoregulator

Syringe Insulin ขนาด 1 มิลลิลิตร

เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า Havard Double Channel Stimulator

1.3 สารทดลอง

พิษงูเห่าไทย (Crude Cobra Venom)ของงูเห่าพันธุ์ Naka naja Kaouthia จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย

เซรุ่มแก้พิษงู (Monovalent Antivenom) จากงูเห่าพันธุ์ Naja naja Kaouthia ที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Calcium chloride-2- hydrat Krist reinst (Merck)

Beta Blocker ใช้ Propranorol hydrochloride ภายใต้เครื่องหมายการค้า Inderal (ICI)

1.4 การให้สารทดลอง

หลังจากเนื้อเยื่อถูกปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลอง เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีแล้ว จะเริ่มให้สารทดลองลงใน organ bath โดยใช้ Syringe Insulin

2. วิธีการ

2.1 ศึกษาผลของพิษงูเห่าต่ออัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากหนูขาว

2.1.1 การเตรียมหัวใจเพื่อการทดสอบทำเป็นกลุ่มควบคุม

เตรียมสัตว์ทดลอง (หนู) ที่ถูกทำให้สลบโดยการดึบริเวณรอยต่อหัวและก้านคอ หลังตัดคอหนูรีบผ่าตัดเปิดช่องอก ตัดแยกหัวใจออกมาใส่ใน petri-dish ที่บรรจุสารละลายริงเกอร์ลอค (Ringer-Locke; ตารางที่ 3) และมีก๊าซออกซิเจน 100% อยู่ แยกหัวใจห้องล่างและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกอย่างระมัดระวัง เมื่อได้ส่วนของหัวใจห้องบนแล้ว แยกเป็นซ้ายและขวา นำหัวใจทั้งสองส่วนนี้ใส่ไว้ใน organ bath ที่บรรจุสารละลายริงเกอร์ลอค มีก๊าซออกซิเจน 100% ผ่านตลอด และควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ปลายด้านหนึ่งของหัวใจที่แยกออกมาผูกกับ Isometric force transducer ซึ่งต่อกับ Sekonic recorder ด้วย Harvard transducer amplifier ระหว่างที่รอให้เนื้อเยื่อปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลองอย่างน้อย 30 นาที จะมีการเปลี่ยนสารละลายทุก 10 นาที เพื่อให้อัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจคงที่ก่อนให้สารทดลองในห้องหัวใจห้องบนขวาซึ่งสามารถเต้นได้เองจะนำมาศึกษาผลของพิษงูเห่าต่ออัตราการเต้นของหัวใจ ส่วนหัวใจห้องบนซ้ายจะนำมาศึกษาผลของพิษงูเห่าต่อแรงบีบตัวของหัวใจ จากการที่หัวใจด้านซ้ายไม่สามารถเต้นได้เอง จึงต้องใช้เครื่องกระตุ้นไฟฟ้ามากระตุ้นให้เกิดการบีบตัว โดยผ่าน platinum electrode โดยใช้ความแรงของการกระตุ้น 5 โวลต์ ระยะเวลาการกระตุ้น 5 millisecond และความถี่ 250 ครั้ง/นาที การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจที่เกิดขึ้นจะบันทึกลงบน paper recorder โดยผ่านทาง isometric transducer เริ่มบันทึกการทำงานของหัวใจทุก 1,2,3,5 นาที และต่อไปทุก 5 นาที จนถึง 30 นาที เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม ใช้ระยะเวลาทั้งสิ้นสองชั่วโมง

2.1.2 การทดลองพิษงูเห่า

เมื่อเตรียมหัวใจหนูด้วยวิธีการข้อ 2.1.1 และรอจนหัวใจทำงานคงที่ประมาณ 30 นาทีแล้วเริ่มเติมพิษงูขนาด 10 ไมโครกรัม ลงใน organ bath ทำการบันทึกผลตั้งแต่นาทีที่ 1,2,3,5 และต่อไปทุก 5 นาทีจนครบ 30 นาที แล้วเติมพิษงูขนาด 20, 30 และ 40 ไมโครกรัม ทุก 30 นาที ตามลำดับ บันทึกด้วยวิธีการเดิม การเติมพิษเป็นลักษณะ cumulated doses

2.2 ศึกษาผลของโปรปรานอรัล (Propranolol) ต่ออัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากหนูขาวเมื่อให้พิษงูร่วมด้วย

2.2.1 เตรียมหัวใจหนูด้วยวิธีการข้อ 2.1.1 ให้โปรปรานอรัล 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก่อนการทดลอง 10 นาที บันทึกผลการทำงานเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 ทำเป็นกลุ่มควบคุม

2.2.2 ด้วยวิธีการข้อ 2.2.1 เมื่อให้โปรปรานอรัล 10 นาที เริ่มเติมพิษงูแต่ละขนาดด้วยวิธีการข้อ 2.1.2 เปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มควบคุมที่ให้โปรปรานอรัลอย่างเดียว และกับกลุ่มที่ให้พิษงูอย่างเดียว ซึ่งอยู่ในเงื่อนไขของเวลาและสภาวะการทดลองเหมือนกัน

2.3 ศึกษาผลของการให้เซรุ่มแก้พิษงู ต่ออัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากหนูขาวเมื่อให้พิษงูร่วมด้วย

เตรียมหัวใจหนูด้วยวิธีการข้อ 2.1.1 แล้วเติมเซรุ่มแก้พิษงูพร้อม ๆ กับพิษงูแต่ละขนาด (ขนาดที่ใช้ 0.6 mg/10 ml) บันทึกผลเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2

2.4 ศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนของหนูขาวที่แยกออกมาเมื่อให้พิษงูร่วมด้วย

เตรียมการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2, ข้อ 2.2.2 และ ข้อ 2.3 จนถึงขนาดของพิษงูที่ทำให้หัวใจเริ่มหยุดทำงาน จึงเติมแคลเซียมคลอไรด์ .54 mM ลงใน organ bath แล้วบันทึกผลการทำงานของหัวใจ

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลอง จะรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean ± Standard Error of the Mean) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้ Student's Unpaired t-test ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมี

017018

นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$)

3.1 ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มศึกษาได้รับพิษงูแต่ละขนาด

3.2 ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ให้โปรปรานอรัลกับกลุ่มทดลองที่ได้รับพิษงูร่วมกับโปรปรานอรัล

3.3 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับพิษงูกับกลุ่มที่ได้รับพิษงูร่วมกับโปรปรานอรัล

3.4 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับพิษงูอย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับพิษงูร่วมกับเซรุ่มแก้พิษงู

**ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของสารละลายริงเกอร์ลอค (Ringer-Locke) ใน 1 ลิตร**

| สารเคมี | สารละลายริงเกอร์ลอค (มิลลิโมล) |
|---|---|
| NaCl | 154 |
| $NaHCO_3$ | 5.9 |
| KCl | 5.6 |
| $CaCl_2$ | 1.08 |
| Glucose | 5.55 |
| $O_2$ 100% | |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย