บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 วัสดุ สัตว์ทดลองและเครื่องมือ

2.1.1 ยางคางคกแห้ง (dried toad venoms)

2.1.2 สารเคมี

2.1.2.1 Norepinephrine

2.1.2.2 Propranolol (Imperial Chemical Industries Limited)

2.1.2.3 Phentolamine

2.1.2.4 dl - Isoproterenol HCl (Sigma Chemical Company)

2.1.2.5 5 - Hydroxytryptamine (Sigma Chemical Company)

2.1.2.6 Cyproheptadine

2.1.3 สัตว์ทดลอง

2.1.3.1 แมว

2.1.3.2 กระต่าย

2.1.3.3 หนูตะเภา (Guinea pigs)

2.1.3.4 หนูถีบจักร (Mice)

2.1.4 เครื่องมือ

2.1.4.1 Polygraph Four Channel Recorder (Grass)

2.1.4.2 Physiological Pressure Transducer (Bell and Howell Limited)

2.1.4.3 Harvard Apparatus Recorder (Model 350)

2.1.4.4 Harvard Apparatus Isometric Force Transducer

2.1.4.5 Harvard Apparatus Isotonic Force Transducer

2.1.4.6 Harvard Apparatus Infusion/Withdrawal Pump

2.1.4.7 Harvard Apparatus Kymograph

2.1.4.8 Isolated Organ Tissue Bath (Phipps and Bird,Inc.)

2.1.4.9 Isolated Heart Perfusion

2.2 วิธีทำการวิจัย

2.2.1 วิธีการเก็บยางคางคกจากต่อม parotoid

นำคางคกที่คัดเลือกแล้วชนิด Bufo melanostictus Schneider ดังรูปที่ 1 มาล้างผิวให้สะอาด จับคางคกให้อยู่ใต้กลองพลาสติกที่มีด้านข้างเปิดสองด้าน และมี petridish ติดอยู่ภายใน ใช้ forcep หนีบที่ต่อม parotoid ทั้งสองข้าง ยางจะพุ่งออกมาติดที่ petridish ยางมีลักษณะสีขาวคล้ายน้ำนมข้น ส่วนที่ซึมออกมารอบ ๆ บริเวณต่อมใช้ไม้กลม ๆ สะอาดปาดและเก็บรวบรวมไว้ นำยางที่รวบรวมทั้งหมดไปชั่งหาน้ำหนักยางสด แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ถูกแสงแดดเป็นเวลา 3 - 5 วัน จะได้สารเป็นแผ่นสีน้ำตาลออน เปราะ ชั่งหาน้ำหนักของยางแห้ง

2.2.2 เตรียม Stock solution 0.33 % ใน 47.5 % ethyl alcohol

ชั่งยางคางคกแห้ง 100 มก. บดให้ละเอียดในโกร่ง ละลายด้วย 15 มล. 95 % ethyl alcohol แล้วทำให้เจือจางด้วย normal saline ให้ครบ 30 มล. กรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายที่ได้ไม่ใสมีตะกอนละเอียดแขวนลอยอยู่ เก็บใส่ขวดสีน้ำตาลแช่ตู้เย็นไว้ stock solution จะเตรียมขึ้นใหม่ทุก 1 เดือน ความเข้มข้นของสารละลายที่นำมาใช้ทำการทดลอง 0.1 มก./มล. โดยทำให้เจือจางด้วย normal saline สารละลายยางคางคกที่ได้นี้มี ethyl alcohol อยู่ประมาณ 1.425 %

2.2.3 ศึกษาอาการพิษทั่วไปของสารละลายยางกางคกในสัตว์ทดลองปกติ

2.2.3.1 ศึกษาอาการพิษทั่วไปในหนูถีบจักร นน. 20 - 25 กรัม ทั้ง 2 เพศ จำนวน 5 ตัวในแต่ละขนาดของสารละลายยางกางคก โดยการฉีดสารละลายยางกางคก (ขนาด 10,15,20 มก./นน. 1 กก.) เข้าหลอดเลือดดำที่หาง สังเกตอาการพิษที่เกิดขึ้นเทียบกับหนูถีบจักรที่ฉีดด้วย ethyl alcohol 1.425 %

2.2.3.2 หา LD_{50} ในหนูถีบจักรโดยวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949) โดยใช้หนูถีบจักร 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว น้ำหนัก 20 - 22 กรัมเพศตัวผู้ โดยฉีดสารละลายยางกางคก (สารละลายยางกางคกที่ใช้ เตรียมโดยใช้ยางกางคกแห้ง 200 มก. บดให้ละเอียดละลายด้วย 5 มล. 95 % ethyl alcohol และ dilute ด้วย normal saline ให้ครบ 50 มล. กรอง จะได้สารละลายยางกางคก 0.4 % ใน 10 % ethyl alcohol)
เข้าหลอดเลือดดำที่หาง (Intravenous injection) และบริเวณช่องท้อง (Intraperitoneal injection) ในขนาดต่าง ๆ กัน สังเกตอาการพิษที่เกิดขึ้นภายใน 1 ชั่วโมง นับจำนวนหนูถีบจักรที่ตายในแต่ละกลุ่ม และที่ตายเพิ่มขึ้นในอีก 3 วัน เขียนกราฟหา LD_{50}

2.2.3.3 ศึกษาอาการพิษทั่วไปในกระต่าย (กระต่าย 5 ตัว นน. 1.3 - 1.7 กก. ทั้ง 2 เพศ) โดยฉีดสารละลายยางกางคก (ขนาด 1 และ 1.5 มก./นน.1 กก.) เข้าหลอดเลือดดำที่ใบหู สังเกตอาการพิษที่เกิดขึ้นเทียบ

กับกระต่ายที่ฉีดด้วย ethyl alcohol 47.5 %

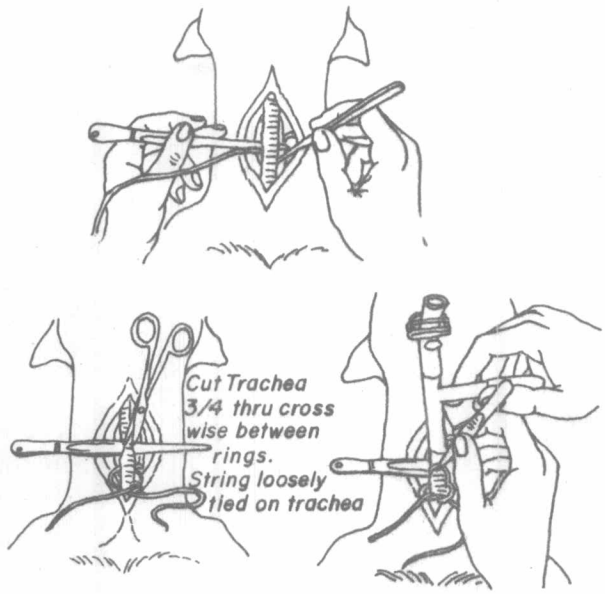
2.2.4 ศึกษาฤทธิ์ของสารละลายยางคางคกในสัตว์ทดลองที่สลบ

การทดลองทำในแมว(นน. 1.7 - 2 กก. ทั้ง 2 เพศ จำนวน 6 ตัว) โดยทำให้สลบด้วยการฉีด Pentobarbital sodium 35 มก./นน.1 กก. เข้าที่ช่องท้อง จับแมวนอนหงายบนโต๊ะสำหรับทำการทดลอง ผูกขาทั้งสี่ขากับหลัก ยึดกออกเพื่อช่วยให้หายใจสะดวก ผ่าตรงบริเวณหลอดลม สอดหลอดแก้ว 3 ทางเพื่อช่วยการหายใจและเพื่อดูดเอาเสมหะหรือ secretion ออกจากหลอดลม ดังรูปที่ 2 ก ผ่าตัดหนังบริเวณขาพับด้านในเพื่อสอด polyethylene tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.066 นิ้ว เข้าไปในหลอดเลือดดำที่ขา (femoral vein) สำหรับให้ยาแก่สัตว์ทดลอง และสอด Polyethylene tube ที่บรรจุ Heparin (100 ยูนิต/1 มล. ใน normal saline) เข้าไปใน Femoral artery เพื่อวัดความดันโลหิต โดยที่ปลายข้างหนึ่งของ polyethylene tube ต่อเข้ากับ pressure transducer และเข้า recorder ดังรูปที่ 2 ข ทำการวัดคลื่นไฟฟ้าของหัวใจ (Electro-cardiogram,ECG) โดยใช้ lead II บางการทดลองใช้เครื่องวัดอัตราการเต้นของหัวใจ โดยดูการนำ impulse จาก ECG lead II และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของการหายใจจาก abdominal respiration ทำการทดลองใช้สารละลายยางคางคกในแมวที่ให้ยาสลบนี้ เพื่อต้องการดูการเปลี่ยนแปลงต่อความดันโลหิต ECG และอาการพิษอื่น ๆ ที่เกิดเมื่อให้ปริมาณสารละลายยางคางคกในขนาดต่าง ๆ กัน (0.25 - 1 มก./นน.1 กก.) จนถึงขั้นที่ทำให้เกิดพิษรุนแรงถึงตาย

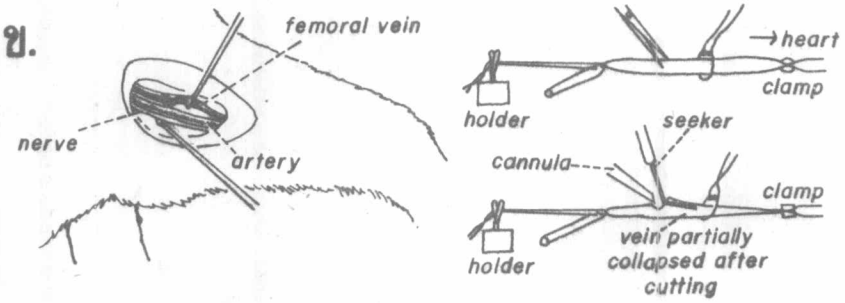
2.2.5 ศึกษาฤทธิ์ของสารละลายยางคางคกต่ออวัยวะที่แยกออกมาจากสัตว์ทดลอง

2.2.5.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารละลายยางคางคกต่อหัวใจที่แยกออกมาจากหนูตะเภา

ก.



ข.



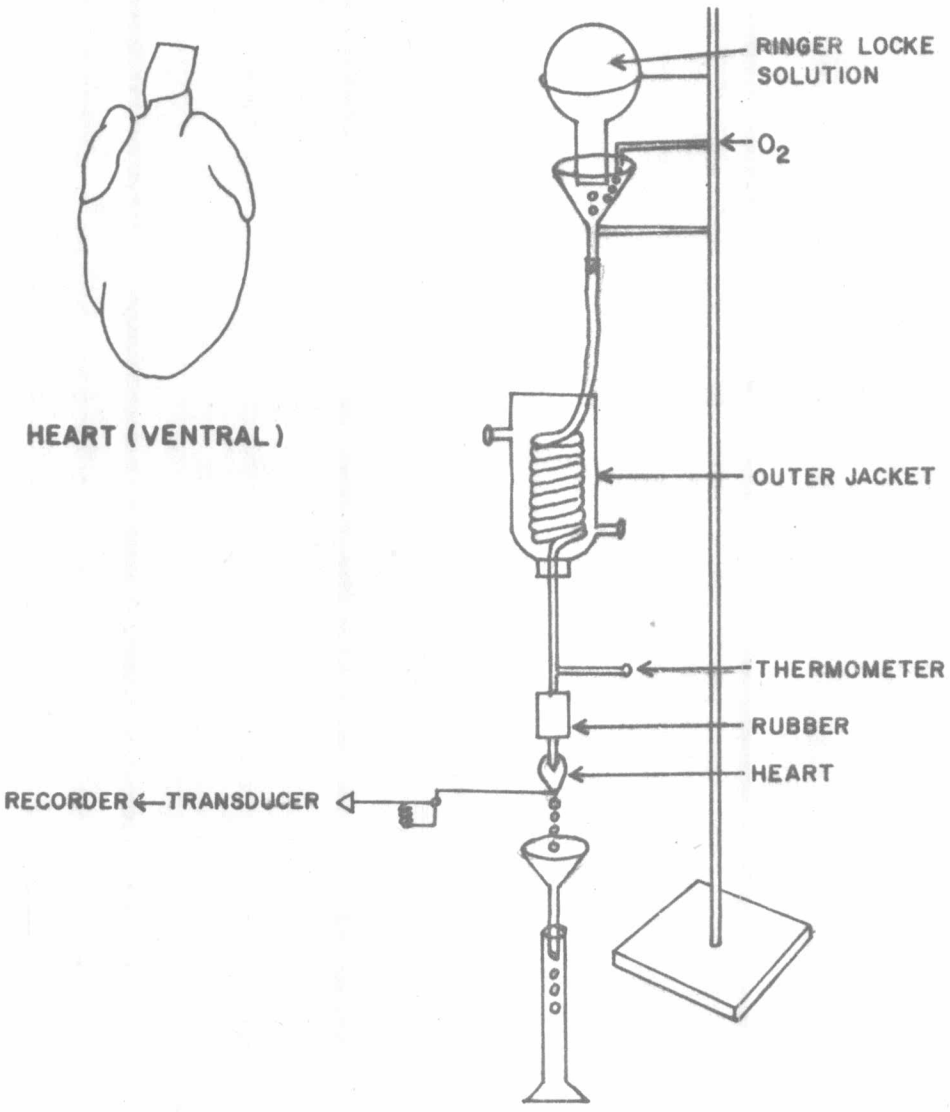
รูปที่ 2

ก. บน แสดงการ Cannulate Trachea ในแมว

ข. ล่าง แสดงการ Cannulate Femeral artery และ Femeral Vein ในแมว

เตรียมหัวใจของหนูตะเภา(นน. 225 - 300 กรัม ทั้ง 2 เพศ จำนวน 5 ตัว) โดยวิธีของ Langendroff (1895) ดังนี้ ทำให้หนูตะเภาหมดความรู้สึก โดยการตีบริเวณรอยต่อของส่วนหัวกับส่วนกอ ใช้กรรไกรตัดหนังและกระดูกซี่โครงเพื่อนำเอาหัวใจออกมาโดยเร็ว ตัด Aorta ให้เหลือติดไว้ยาวอย่างน้อย 1 เซนติเมตร นำหัวใจแช่ใน dish ที่มีสารละลาย Ringer - Locke (ส่วนประกอบ ตารางที่ 1) สารละลายนี้อุณหภูมิ 37°C และมี pure O_2 ตลอดเวลา บีบหัวใจ 2 - 3 ครั้ง เพื่อไล่เลือดที่อยู่ในหัวใจออกให้หมด ผูก Aorta ไว้ที่ปลายสุดของ cannula ของเครื่อง Perfusion apparatus ดังรูปที่ 3 การเตรียมเครื่องมือนี้ต้องไล่อากาศออกให้หมดตั้งแต่ใน contol ที่ใส่สารละลาย Ringer-Locke ซึ่งใช้เป็น reservoir ไล่อากาศลงมาตามหลอดแก้วที่ขดอยู่ใน jacket จนถึงปลายกระเปาะหลอดแก้วที่ใช้ผูกหัวใจ perfusion fluid ที่ถูกพักไว้ใน reservoir ที่มี O_2 ตลอดเวลานี้จะให้ pressure คงที่ fluid จะไหลมาตามขดแก้วใน jacket ซึ่งแช่อยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิคงที่ 37 °C ความดันจาก perfusion fluid จะดันให้ fluid ไหลไปตาม coronary vessels ที่ไปเลี้ยงหัวใจ Fluid ที่ไหลผ่านหัวใจจะหยดลงใน cylinder ที่มีกรวยรองรับ สารที่จะทดลองจะฉีดเข้าบริเวณเหนือที่ผูกหัวใจ perfusion rate ประมาณ 40 - 50 หยดต่อนาที การบันทึกผลการทดลองทำโดยใช้ขอเกี่ยวที่ปลาย ventricles ขอนี้มีด้ายผูกติดอยู่ ผ่านด้ายไปยังรอกของ lever นำปลายด้ายผูกกับ Isometric force transducer และต่อเข้าเครื่อง Recorder บันทึกผลลงบนกระดาษ นอกจากใช้ Recorder แล้วยังใช้เครื่อง Kymograph บันทึกผลลงบน smoked drum ซึ่งไม่ต้องใช้ Isometric force transducer

การทดลองสารแต่ละครั้งต้องรอให้หัวใจคืนสู่สภาพเดิมเสียก่อนจึงจะทดลองต่อไป โดยดูที่ rate และ amplitude ว่าเท่าเดิมหรือไม่ อาจจะเป็นค่าใหม่ที่แตกต่างจากตอนแรก แต่ต้องคงที่อยู่ในระดับหนึ่งจึงจะให้ได้ ก่อนการทดลองสารละลายยางกางคก ใช้ ethyl alcohol 1.425 % ทดลอง



รูปที่ 3 แสดงการเตรียม Isolated perfused heart (Langendorff's preparation) ของกระต่าย

สารเคมี	จำนวนกรัมต่อลิตร	Electrolyte	จำนวนมิลลิโมลา/ลิตร
NaCl	9.0	Na^{+}	155.8
KCL	0.42	K^{+}	5.6
$CaCl_2$	0.24	Ca^{+2}	4.3
$NaHCO_3$	0.5	Cl^{-}	163.9
Glucose	1.0	HCO_3^{-}	1.8
Aerating pass	pure O_2		

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ Ringer Locke solution

เสียก่อนเพื่อไว้ใช้เปรียบเทียบดูผล

2.2.5.1.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารละลายยางคางคกในขนาดต่าง ๆ กัน (0.005,0.01,0.015, 0.02,0.03 มก.) โดยการฉีดแบบ Bolus injection นับอัตราการเต้นของหัวใจเป็นครั้ง/นาที วัดแรงบีบตัวของหัวใจเป็น amplitude (มม.) ความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการทดลองคิดเป็นร้อยละ (△ %)

2.2.5.1.2 ศึกษาฤทธิ์ของ β-blocking agent (Propranolol) (ขนาด 0.7 มก.) ต่อการออกฤทธิ์ของสารละลายยางคางคก (0.03 มก.) และสาร β-stimulating agent (Isoproterenol) (ขนาด 0.00125 มก.) นับอัตราการเต้นของหัวใจเป็นครั้ง/นาที และวัดแรงบีบตัวของหัวใจเป็น amplitude (มม.) ความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการทดลองคิดเป็นร้อยละ (△ %)

2.2.5.1.3 ศึกษาฤทธิ์ของสารละลายยางคางคกในขนาดต่าง ๆ กัน (0.0125,0.025,0.083, 0.167 มก./นาที) โดยวิธี infusion ใช้เครื่องมือ Infusion pump ดูผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะของจังหวะการเต้นของหัวใจ อัตราการเต้นของหัวใจและแรงบีบตัวของหัวใจ จนกระทั่งเกิดพิษที่เด่นชัด

2.2.5.2 ศึกษาฤทธิ์ของสารละลายยางคางคกต่อหัวใจห้องบน (Auricles) ที่แยกออกมาจากหนูตะเภา

เตรียมหัวใจห้องบนดังนี้ ทำให้หนูตะเภา(นน. 225 - 300 กรัม ทั้ง 2 เพศ จำนวน 5 ตัว)หมดความรู้สึกโดยตีบริเวณรอยต่อของส่วนหัวกับส่วนคอ ใช้กรรไกรตัดหนังและกระดูกซี่โครงเพื่อนำเอาหัวใจออกมาโดยเร็ว แช่ใน dish ซึ่งมีสารละลาย Ringer - Locke อุณหภูมิ 30°C (Langendorff, 1895) มี pure O_2 ตลอดเวลา แยกส่วนที่เป็นหัวใจห้องล่าง (Ventricles) และเนื้อเยื่อ อื่น ๆ รวมทั้ง Aorta ที่ติดอยู่ออกให้หมดเหลือแต่ Auricles ทั้งสองข้างใช้เข็มร้อย ด้ายแทงที่ปลายแต่ละข้างของ Auricles เพียงเล็กน้อย ปลายข้างหนึ่งผูกกับขอแก้ว นำไปแขวนใน chamber ซึ่งมีสารละลาย Ringer - Locke อยู่ประมาณ 60 มล. มี pure O_2 ตลอดเวลา chamber นี้อยู่ใน Isolated Organ - Tissue bath ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ 30°C ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งของ Auricles ผูกเข้ากับ Isometric force transducer ต่อเข้าเครื่อง Recorder ดังรูปที่ 4

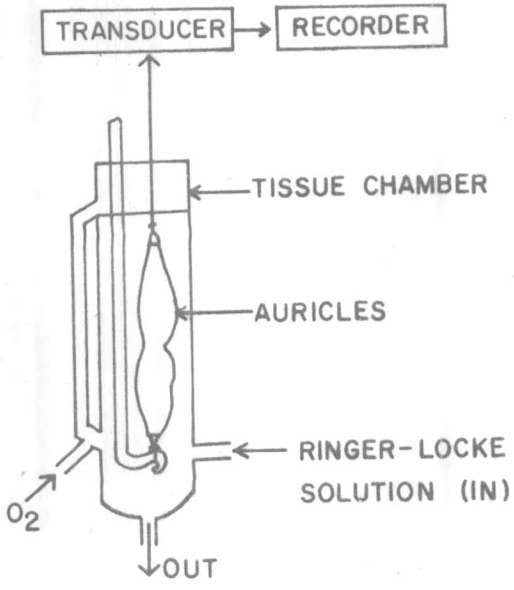
เมื่อทดลองสารแต่ละครั้งแล้วต้องล้าง Auricles หลาย ๆ ครั้ง และหยุดพักเพื่อให้กลับสู่สภาพเดิม จำนวนครั้งที่ล้างและเวลาที่หยุดพัก แล้วแต่สารที่ใช้ทดลอง การที่จะทราบว่า Auricles คืนสู่สภาพเดิมหรือไม่โดยดูที่ rate และ amplitude เช่นเดียวกับการทดลองในหัวใจที่แยกออกมาดังกล่าวข้างต้น และก่อนการทดลองใช้ ethyl alcohol 1.425 % ทดลองก่อนเพื่อใช้เปรียบเทียบดูผล

2.2.5.2.1 ศึกษาฤทธิ์ของสาร β - blocking agent (Propranolol) (ขนาด 0.0005 มก./มล. ต่อการออกฤทธิ์ของสารละลายยางคางคก และสาร β - stimulating agent (Isoproterenol) (ขนาด 0.00002 มก/มล.) นับอัตรา

006878

HEART (VENTRAL)

AURICLES



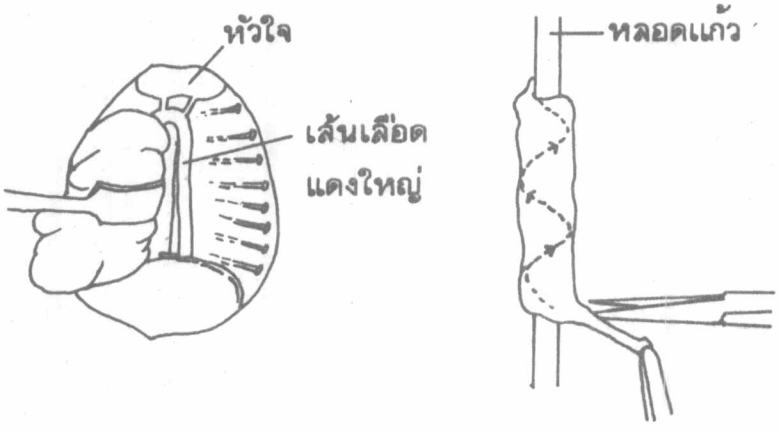
รูปที่4 แสดงการเตรียม Isolated auricles โดยใช้หัวใจห้องบนของหนูตะเภา

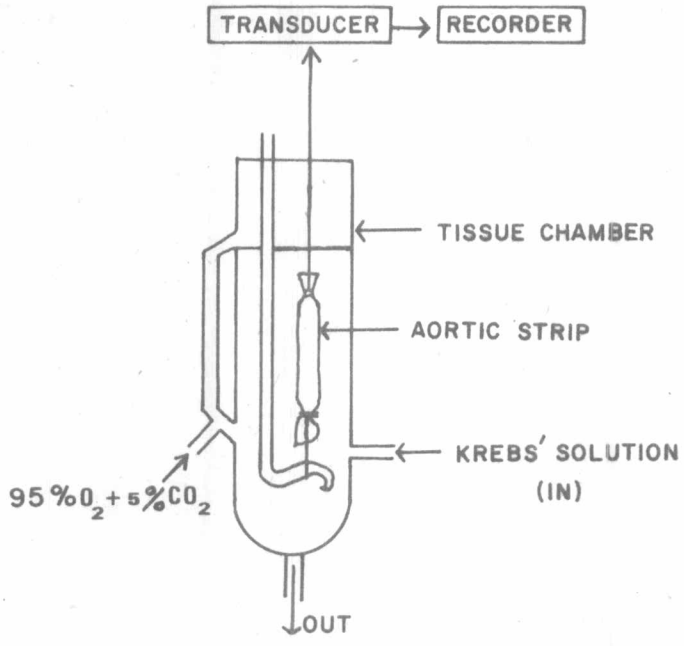
การเต้นของ Auricles เป็นครั้ง/นาที และวัดแรงบีบตัวของ Auricles เป็น amplitude (มม.) ความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการทดลองคิดเป็นร้อยละ (Δ %)

2.2.5.3 ศึกษาฤทธิ์ของสารละลายยางคางคกต่อหลอดเลือดแดง (Aorta) ที่แยกออกมาจากกระต่าย

เตรียม Aortic strip โดยทำให้กระต่าย(นน.1.5 - 1.7 กก. ทั้ง 2 เพศ จำนวน 5 ตัว)หมดความรู้สึกด้วยการตีแรง ๆ บริเวณรอยต่อของส่วนหัวกับส่วนคอ ใช้กรรไกรตัดหนังและกระดูกซี่โครงค่อนไปทางซ้าย เปิดดูจะเห็น descending Aorta ต่อจากหัวใจ Clamp ช่วงบนและช่วงล่างของหลอดเลือด ตัดบริเวณตรงกลางหลอดเลือดออกมายาวประมาณ 1 นิ้ว นำใส่ dish ซึ่งมี Krebs' solution (ส่วนประกอบ ตารางที่ 2) ซึ่งมีอุณหภูมิ 37°C และมี 95 % O_2+ 5 %CO_2 ตลอดเวลา ตัดเศษเนื้อเยื่อ ไขมัน เส้นเลือดฝอยรอบ ๆ Aorta ออกให้หมด ใช้หลอดแก้วเล็ก ๆ สอดเข้า Aorta ตัดเป็น Spiral ให้กว้าง 4 มม. ยาว 4 ซม. (รูปที่ 5) ใช้เข็มร้อยด้ายแทงบริเวณปลายทั้งสองข้างของ Aortic strip ปลายข้างหนึ่งผูกติดกับขอแก้วนำไปแขวนใน chamber ของเครื่องมือ Isolated Organ Tissue bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ 37°C ใน chamber มี Krebs' solution ปริมาณ 60 มล. มีท่อ 95 %O_2 + 5 %CO_2 ต่อเข้าใน chamber ส่วนปลายอีกข้างของ Aortic strip ผูกกับ Isotonic force transducer ซึ่งต่อเข้าเครื่อง Recorder บันทึกผลลงบนกระดาษ

ก่อนเริ่มการทดลองต้องรอให้ Aortic strip ใน chamber อยู่ในสภาพคงที่เสียก่อนประมาณ 30 นาที การทดลองแต่ละครั้งไม่ควรให้สารที่ทดลอง contact กับ Aortic strip นานเกิน 2 นาที หลังจากล้างสารที่





รูปที่ 5 แสดงการเตรียม Aortic strip ของหนูตะเภาโดยใช้หลอดเลือดแดง Aorta

สารเคมี	จำนวนกรัมต่อลิตร	Electrolyte	จำนวนมิลลิโมลา/ลิตร
NaCl	5.5	Na^{+}	143.3
KCl	0.35	K^{+}	5.9
$MgSO_4 7H_2O$	0.11	Ca^{+2}	2.6
$CaCl_2$	0.28	Mg^{+2}	1.2
KH_2PO_4	0.16	Cl^{-}	128.3
$NaHCO_3$	2.1	$H_2PO_4^{-}$	2.2
Glucose	2.0	HCO_3^{-}	24.9
		SO_4^{*}	1.2
Aerating pass	95 % O_2+ 5% CO_2		

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของ Krebs' solution

ทดลองออกแต่ละครั้งแล้วต้องหยุดพักเพื่อให้ Aortic strip คืนสู่สภาพเดิม

2.2.5.3.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารละลายยางคางคกในขนาดต่าง ๆ กัน (0.16,0.25,0.30 ไมโครกรัม/มล.) โดยมี Norepinephrine (ขนาด 0.0083 ไมโครกรัม/มล.) เป็นตัวเปรียบเทียบ วัดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นเป็น ซม.

2.2.5.3.2 ศึกษาฤทธิ์ของ α - blocking agent (Phentolamine) (ขนาด 0.16 ไมโครกรัม/มล.) ต่อการออกฤทธิ์ของสารละลายยางคางคก (ขนาด 0.25 ไมโครกรัม/มล.) และ Norepinephrine (ขนาด 0.0083 ไมโครกรัม/มล.) วัดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงที่เกิดขึ้น

2.2.5.3.3 ศึกษาฤทธิ์ของสาร Antiserotonin (Cyproheptadine) (ขนาด 1.6 ไมโครกรัม/มล.) ต่อการออกฤทธิ์ของสารละลายยางคางคก (ขนาด 1 ไมโครกรัม/มล.) และ Serotonin (5 - HT) (ขนาด 50 ไมโครกรัม/มล.) วัดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงที่เกิดขึ้น