วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

นำหนู *m(Ren-2)27* transgenic rat (TG) ซึ่งเป็นหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกสอดแทรกยีน renin ที่มีอายุ 2 วัน, 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ หลังคลอด และหนู Sprague Dawley ที่ไม่ได้รับการสอดแทรกยีน (SD) ที่อายุเท่ากัน กลุ่มละ 6 ตัว (รวมทั้งหมด 36 หัวใจ) มาทำให้สลบโดยการฉีดด้วย pentobarbiton sodium (100 mg/kg) เข้าทางหน้าท้อง จากนั้นเปิดช่องอกเพื่อนำหัวใจออกมา แล้วแช่น้ำยา 10% formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหัวใจหนูมาผ่านขบวนการ Tissue processing for Wax embedding แล้วตัด serial sections หนา 5 μm ทั้งหัวใจ และ mount sections บน TESPA coated glass slide (5 sections ต่อ 1 slide)

หมายเหตุ หนู SD และ TG ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Terry Bennett และ Prof. Sheila Gardiner Nottingham University, Nottingham UK.

2. ชี้แสดงตำแหน่งของ Conduction system (SA node และ AV node) โดยสุ่มเลือก sections (screening sample) มาย้อมด้วย Masson Trichrome เพื่อชี้แสดงว่า section ใดมี SA node หรือ AV node

3. ศึกษาปริมาณของเซลล์ของ conduction system ที่มีการตายแบบ apoptosis

3.1 เลือก section มาจำนวน ½ ของจำนวน section ทั้งหมดของแต่ละหัวใจที่มี SA node หรือ AV node โดยเลือก 1 slide เว้น 1 slide ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ (อีก ½ ของจำนวน section ทั้งหมดใช้สำหรับศึกษาปริมาณของ AT_1 receptors) จากนั้นชี้แสดงเซลล์ของ conduction system ที่เกิดการตายแบบ apoptosis โดยใช้วิธีการที่เรียกว่า TUNEL Technique (TdT-mediated DUTP-biotin nick end labeling) (Sarraste and Pulkki, 2000; Yaoita *et al.*, 1992; James, 1998) โดยใช้ Fluorescein-FragEL TM kit แล้วนับจำนวนของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis โดยนับเฉพาะ section ที่ 1 ของแต่ละ slide และหาปริมาณพื้นที่ของ AV node หรือ SA node โดยใช้โปรแกรม Microimage analysis (Olympus)

Number of labeled nuclei per unit area = $\frac{\text{Number of apoptotic nuclei}}{\text{Area of sections examined}}$

3.2 เปรียบเทียบปริมาณของเซลล์ของ conduction system ที่เกิดจากการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ TG และ SD ที่อายุเท่ากัน โดยใช้ทางสถิติ unpaired T test

4. ศึกษาปริมาณของ AT_1 receptors บนเซลล์ของ conduction system โดย

4.1 นำ slide ที่อยู่ถัดจาก slide ที่มี sections ที่ใช้ย้อมปริมาณ apoptosis ทั้งหมดมาย้อมหาปริมาณของ AT_1 receptors (โดยใช้วิธี immunohistochemistry technique และใช้ AT_1 receptors antibody (polyclonal rabbit anti AT_1 receptors) (Timmermans *et al*, 1993, Murphy *et al*, 1991, Marrero *et al*, 1995) ดูด้วยกล้อง confocal laser scanning

4.2 หาปริมาณของ AT_1 receptor บนเซลล์ของ conduction system ใน TG และ SD โดยนับจำนวน AT_1 receptor โดยนับเฉพาะ section ที่ 1 ของแต่ละ slide และหาพื้นที่ของ AV node หรือ SA node โดยใช้โปรแกรม Microimage analysis (Olympus)

Number of AT_1 receptor per unit area = $\frac{\text{Number of } AT_1 \text{ receptor}}{\text{Area of sections examined}}$

4.3 เปรียบเทียบปริมาณของ AT_1 receptor บนเซลล์ของ conduction system ใน TG และ SD ที่มีอายุเท่ากัน โดยใช้วิธีทางสถิติ unpaired T test