



บทที่ ๒

วัสดุและวิธีการทำวิจัย (Materials and Methods)

๑. หนูที่ใช้ทดลอง : หนูเพศผู้พันธุ์ วิสตาร์ (Wistar) น้ำหนักระหว่าง ๒๒๐-๓๒๐ กรัม

๒. สารเคมีและยาที่ใช้ทดลอง

๒.๑ การทดลองพฤติกรรมการหมุน (Turning behavior) ในระบบโดปามีน

- 6-hydroxy-dopamine (Sigma Chemical Company) (6-OH-DA)

- apomorphine hydrochloride (Sigma Chemical Company)

- haloperidol (Janssen)

๒.๒ การทดลองพฤติกรรมในระบบซีโรโตนิน

- 5-hydroxytryptophan (Sigma Chemical Company) (5-HTP)

- cyproheptadine

- methysergide (Sandoz)

๒.๓ indole alkaloids จาก *Uncaria salaccensis*

- 3-Isoajmalicine (I₁)

- 19-epi-3-Isoajmalicine (I₂)

- uncarine B (O-1)

- mitraphylline (O-2)

๓. การศึกษาทดลองผลของยา/สาร ต่อพฤติกรรม

๓.๑ การทดลองพฤติกรรมการหมุน (Turning behavior) ในระบบโดปามีน

การศึกษามผลของยาและสารที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการหมุนของหนูนั้นจะต้องทำ

ให้หนูที่ได้รับการทำลาย dopamine nerve cell ใน substantia nigra ข้างหนึ่งด้วย

6-hydroxydopamine การเตรียมหนูทดลองทำโดยการทำให้หนูสลบก่อน โดยใช้ pentobar -

bital sodium ขนาด ๔๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ฉีดเข้าในช่องท้อง (Perito -

neum) เมื่อสลบแล้ว นำหัวเขตรึงใน stereotaxic head holder แล้วจึงฉีด

6-hydroxydopamine เข้าไปที่ substantia nigra ข้างใดข้างหนึ่งโดยใช้ microsyringe

(Halminton syringe) ซึ่งเข้าสู่ตำแหน่งโดย stereotaxic carrier โดยตำแหน่งของ จุดที่ฉีดมี Co-ordinate อยู่ที่ ๓ มิลลิเมตรหลังรอยต่อ bregma, ๓ มิลลิเมตรด้านซ้ายจากแนว sagittal suture, และ ๘ มิลลิเมตรต่ำลงมาจาก dura mater ตาม atlas ของ Pellegrino และ Cushman (1980) microsyringe ดังกล่าวนี้นี้มีขนาด ๑๐ ไมโครลิตร มีปลายเข็มขนาด 30 gauge ซึ่งเราจะบรรจุ 6-hydroxydopamine อยู่ หนูแต่ละตัวจะได้รับ 6-hydroxydopamine ขนาด ๘ ไมโครกรัมละลายในน้ำเกลือ ๐.๘% ปริมาณ ๘ ไมโครลิตร โดยมี ascorbic acid ละลายอยู่ประมาณ ๐.๒ มิลลิกรัมต่อน้ำเกลือ ๑๐๐ มิลลิลิตร สารละลาย ดังกล่าวจะต้องเย็น และเตรียมใหม่ทุกครั้ง เมื่อปลายเข็มอยู่ในตำแหน่งที่ต้องการแล้ว จึงค่อยๆ ดันลูกสูบของ microsyringe เข้าไปอย่างช้าๆ ในอัตราเร็วประมาณ ๑ ไมโครลิตรต่อนาที แล้วปล่อยให้ผ่านไปประมาณ ๕ นาที จึงค่อยๆ ถอนปลายเข็มจากตำแหน่งที่ฉีดอย่างช้าๆ (Ungerstedt, 1971; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970) ภายหลังจากฉีด 6-hydroxydopamine ไปแล้ว จึงเย็บปิดรอยแผลที่ผ่าแล้วปล่อยให้สัตว์ทดลองฟื้น และเลี้ยงหนู ต่อไปอีกประมาณ ๑ สัปดาห์ จึงนำมาทดสอบด้วย apomorphine หนูที่ถูกทำลาย dopamine nerve cell ใน substantia nigra เมื่อได้รับ apomorphine ขนาด ๑ มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัมทาง subcutaneous จะแสดงพฤติกรรมของการหมุน โดยใช้ขาหลังเป็นจุด หมุน และใช้ขาหน้าเดิน หนูจะหมุนหนีไปจากด้านที่เราทำลาย dopamine nerve cell (contralateral turning) (Ungerstedt, 1970) ส่วนหนูที่หมุนผิดด้านหรือไม่หมุน แสดงว่าการทำลายระบบโดปามีนคงเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ก็จะไม่นำมาใช้ทดสอบยาอีกต่อไป

การวัดพฤติกรรมการหมุน (Measurement of circling behavior)

พฤติกรรมการหมุนของหนูเป็นชนิด contralateral turning ซึ่งทำให้เกิดขึ้นโดยการให้ apomorphine ในขนาด ๑ มก. ต่อกิโลกรัมน้ำหนัก ฉีดเข้าทาง subcutaneous แล้วเริ่มวัดการหมุนทันทีหลังจากฉีด ยา/สารแต่ละตัวจะใช้กับหนูแต่ละกลุ่มโดยใช้หนู ๔ ตัว ต่อ ๑ กลุ่ม

ในการวัดเราใช้อ่างโลหะรูปครึ่งทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ๔๐ ซม. และนับจำนวนรอบที่หนูในอ่างดังกล่าวโดยนับ ๑ รอบเท่ากับหนูหมุน ๓๖๐ องศา รอบแกนขาหลัง และนับตลอดช่วงละ ๑๐ นาที ติดต่อกัน จนกว่าหนูจะหยุดหมุน หรือประมาณ ๑-๒ ชั่วโมง หนูแต่ละ

ละตัวจะได้รับการบันทึกประวัติการหมุนมาตรฐาน เมื่อให้ apomorphine แต่เพียงอย่างเดียว แล้วนำมาเปรียบเทียบเมื่อหนูกลุ่มเดียวกันนี้ได้รับสาร indole alkaloids ในขนาดต่างๆ กัน เป็นเวลา ๑๔ นาที ก่อนการให้ apomorphine โดยจะทดสอบพฤติกรรมหนูอันเป็นผลจากสาร indole alkaloids ในช่วงระยะเวลา ๑๔-๔๐ วัน ภายหลังการฉีด 6-hydroxydopamine นอกจากนี้ ผลดังกล่าวจะนำมาเปรียบเทียบกับผลการยับยั้งการหมุนของ haloperidol (dopamine antagonist) ซึ่งให้ในขนาด ๐.๑ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก

๓.๒ การทดลองพฤติกรรมการสะบัดหัว (shaking behavior) โดยระบบซีโรโตนิน การทดสอบพฤติกรรมในระบบนี้ เราเลือกใช้การให้ 5-HTP เพียงตัวเดียวใน ขนาดสูงประมาณ ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก ฉีดเข้าทางช่องท้อง (Matthews and Smith, 1980) หนูจะแสดงอาการที่บ่งบอกถึงว่าสมองได้รับการกระตุ้นจากระบบซีโรโตนินโดยเฉพาะ (5-HT syndrome) ลักษณะของกลุ่มอาการดังกล่าวก็คือ

- ๑) มีสั่นทั้งตัวขณะพัก (resting tremor) จะสังเกตเห็นได้ชัดที่หัวและขาหน้า
- ๒) มีการตะปบที่ขาหน้าทั้ง ๒ ขา เป็นจังหวะสลับกัน (reciprocal forepaw treading or rhythmic dorso-ventral movements of forelimbs)
- ๓) มีอาการเกร็งแข็ง (rigidity or hypertonicity)
- ๔) ขาหลังจะกางแผ่ออก (hindlimb abduction)
- ๕) หางชี้ตรงแข็ง (straub tail)
- ๖) หัวสะบัด (head shaking, head tremor)

หนูที่แสดงอาการเพียง ๔ อาการเป็นอย่างน้อย เราก็นับว่าเป็นลักษณะเฉพาะของกลุ่มอาการดังกล่าวได้ (Grahame-Smith, 1971; Jacobs, 1974; 1976)

การวัดพฤติกรรมการสะบัดหัว (Measurement of head shaking)

ในการสังเกตพฤติกรรม จะให้หนูอยู่ในกรงแยกเฉพาะ และสังเกตทีละตัว ยา/สาร แต่ละตัวจะใช้กับหนูแต่ละกลุ่มโดยให้หนู ๔ ตัวต่อ ๑ กลุ่ม ในการวัดครั้งนี้เราถือเอาจำนวนการสะบัดหัวของหนูเป็นตัวกำหนดคะแนนของพฤติกรรมที่เกิดจากการกระตุ้นของระบบซีโรโตนินในสมอง (central serotonin-mediated synapses) (Matthews and Smith, 1980) เปรียบเทียบคะแนนของหนูแต่ละกลุ่มเมื่อให้สารต่างๆ กัน ในขนาดต่างๆ กันในแต่ละตัว โดยเริ่ม

เปรียบเทียบผลของ indole alkaloids ทั้ง ๔ ตัว ต่อการยับยั้งผลของซีโรโดนิน กับยาที่เป็น antagonist ของซีโรโดนิน อันได้แก่ cyproheptadine และ methysergide เราจะให้ cyproheptadine ในขนาด ๐.๐๕, ๐.๑, ๐.๒ และ ๐.๔ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตามลำดับในแต่ละกลุ่ม และให้ methysergide ในขนาด ๐.๕, ๑, ๒, ๔ และ ๘ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับเช่นเดียวกัน ยาและสารทุกตัวจะให้ก่อนให้ 5-HTP ประมาณ ๑๕-๒๐ นาที โดยจะให้ทางช่องท้อง สารทุกตัวที่ใช้จะนำมาละลายในน้ำกลั่น ยกเว้น 5-HTP ให้ละลายในน้ำกลั่นที่ผสมกรดเกลือเจือจาง (pH ประมาณ ๕-๖)

การวิเคราะห์ข้อมูล (Analysis of Data)

การแสดงผลการทดลองใช้คะแนนที่แสดงผลตอบสนองทางพฤติกรรมในรูปค่าเฉลี่ย (mean) และค่าความคลาดเคลื่อนของส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ย (standard error of the mean, S.E.) สถิติที่ใช้ทดสอบการเปรียบเทียบผลการตอบสนองต่อสารและยาในการทดสอบพฤติกรรมในระบบโดปามีนเราใช้ paired t-test

ส่วนการทดลองในระบบซีโรโดนิน เราเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบผลของ indole alkaloids ทั้ง ๔ ตัว และยาที่นำมาศึกษาในขนาดต่างๆ กัน และหาค่า E.D₅₀ ของสารทั้ง ๔ ตัว และยาดังกล่าว ตามวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949)

ED₅₀ ในที่นี้คือ ขนาดของสารหรือยาที่มีผลยับยั้งจำนวนการสะบัดหัวลงได้ประมาณร้อยละ ๕๐

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย