บทที่ ๒

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

๒.๑ วัสดุ สัตว์ทดลองและเครื่องมือ

๒.๑.๑ ไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์ (Dioscorine hydrobromide) ซึ่งสกัดได้จากหัวกลอยและผ่านการทดสอบความบริสุทธิ์แล้ว

๒.๑.๒ เคมีภัณฑ์

๒.๑.๒.๑ Pentobarbital sodium (Pentobarbitalum natrium, Veterinaria SA Zurich) 162 mg./ml.

๒.๑.๒.๒ Sodium chloride (May & Baker, LTD. Dagenham, England)

๒.๑.๒.๓ Heparin Leo (Leo Pharmaceutical Products Ballerup-Denmark) 500 ū/ml.

๒.๑.๒.๔ Eletrode Cream (Cam Crene, Canbridge instrument Co., Inc. U.S.A.)

๒.๑.๓ สัตว์ทดลอง

๒.๑.๓.๑ หนูขาว (Rat, Wistar Strain) เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง ๒๐๐-๓๕๐ กรัม สุขภาพสมบูรณ์

๒.๑.๓.๒ หนูถีบจักร (Mice) เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง ๑๘-๒๔ กรัม สุขภาพสมบูรณ์ หนูทุกตัวที่ใช้ในการทดลองจะไม่นำมาทำการทดลองอีก

๒.๑.๔ เครื่องมือ

๒.๑.๔.๑ Eight channel recorder (Grass Model 7 Polygraph, Grass Instrument Co., U.S.A.)

๒.๑.๔.๒ Physiological pressure transducer (Statham(R) Hato, Rey, Puertorico, 17848, P23AC)

๒.๑.๔.๓ Force dislacement transducer (Grass instrument Co. Quincy, Mass., U.S.A.)

๒.๑.๔.๔ Precious metal eletrode for ECG (E-5 cup shaped 9 mm. disc.)

๒.๑.๔.๕ Polyethylene cannula (Inside diameter 0.030" outside diameter 0.048", 21 ga needle fits into-tubing, for vein and artery)

๒.๑.๔.๖ Polyethylene cannula (Diameter 2.5 mm., for trachea)

๒.๑.๔.๗ Superlight (Japan medical instruments Co., LTD. Tokyo, Japan)

๒.๑.๔.๘ เครื่องมือผ่าตัด ๑ ชุด

๒.๒ วิธีทำการวิจัย

๒.๒.๑ สกัดอัลคาลอยด์ไดออสคอรีน

ขบวนการสกัดอัลคาลอยด์ไดออสคอรีนจากหัวกลอยนั้น ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ ระพีพล ภโววาท[๔๑] ซึ่งดำเนินการโดย อาจารย์บุญยงค์ ตันติสิระ และได้ทดสอบคุณสมบัติและความบริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ดังนี้คือ

๒.๒.๑.๑ ใช้ Dragedorff's reagent เพื่อพิสูจน์ว่าตัวอย่างที่ได้จากการสกัดเป็นอัลคาลอยด์

๒.๒.๑.๒ นำตัวอย่างมาทำรงคเลขผิวบาง (Thin layer chromatrography) โดยใช้ Absorbent และ Solvent system ต่าง ๆ กัน แล้วเทียบค่า Rf กับของตัวอย่างแท้ (Authentic sample)

๒.๒.๑.๓ พิสูจน์จาก Infra red spectrum โดยเปรียบเทียบกับอัลคาลอยด์มาตรฐาน โดยใช้เครื่องมือ Infra red spectrophotometer (Perkin Elmer 283)

๒.๒.๑.๔ หาจุดหลอมเหลวของตัวอย่างที่ได้ (๒๐๗ องศาเซลเซียส) เมื่อต้องการใช้ในการทดลอง จึงนำผลึกนี้มาละลายด้วยน้ำกลั่นตามความเข้มข้นที่ต้องการ

๒.๒.๒ การเตรียมสัตว์ทดลอง

การศึกษาผลของไดออสคอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจ, อัตราการเต้นของหัวใจและความดันโลหิตในหนูที่ถูกทำให้เกิดอาการพิษด้วยเพนโตบาร์บิโทน นั้นได้เตรียมหนูขาวดังนี้คือ (ดังแสดงในรูปที่ ๑)

๒.๒.๒.๑ Anesthesia

ทำให้หนูขาวหมดความรู้สึกโดยฉีดเพนโตบาร์บิโทนขนาด ๓๕ มก./กก.นน. ตัว เข้าทางหน้าท้อง[๔๒] ระหว่างการเตรียมสัตว์ทดลองอาจฟื้น (Recovery) จากระดับความลึกของการสลบระดับที่ ๓ (Surgical anesthesia) เข้าสู่ระดับที่ ๒ (Excitement anesthesia) ซึ่งสังเกตได้จากการตรวจ Reflex และขนาดของม่านตา[๔๓][๔๔][๔๕] ดังนั้นจึงจำเป็นต้องให้เพนโตบาร์บิโทนขนาด ๒๐% ของขนาดที่ให้ครั้งแรก[๔๖] (๓๕ มก./กก.นน.ตัว) เพื่อให้สัตว์ทดลองสลบอยู่ในระดับที่ ๓ ซึ่งเป็นระดับความลึกของการสลบที่เหมาะในการเตรียมสัตว์ทดลอง

๒.๒.๒.๒ Tracheal cannulation

เพื่อป้องกันการอุดตันของสิ่งขับแยก (secretion) ในระบบทางเดินหายใจระหว่างที่สัตว์ทดลองถูกทำให้สลบ จึงจำเป็นต้องเปิดหลอดลมดูดสิ่งขับแยกออกให้หมด

เพื่อช่วยให้สัตว์ทดลองหายใจได้สะดวก โดยจัดให้หนูขาวที่ถูกทำให้สลบแล้วอยู่ในท่านอนหงาย ยึดขาทั้งสี่แยกออกจากกัน (ทั้งขาบนและขาล่าง) จัดให้ติดแน่นอยู่กับแผ่นกระดานรองรับด้วยเทปกาว จับคอยืดให้ตรง กรีดผิวหนังบริเวณคอตามเส้นกลางตัว ยาวประมาณ ๑.๕ เซ็นติเมตร จากนั้นใช้ปากคีบ (Arterial forceps) แยกเนื้อเยื่อต่าง ๆ บริเวณคอออกจนถึงหลอดลม ใช้ด้าย ๒ เส้น ลอดผ่านใต้หลอดลม ณ ตำแหน่งที่ห่างจากด้านล่างของต่อมธัยรอยด์ ประมาณ ๑ เซ็นติเมตร กรีดหลอดลมให้เป็นช่องขนาดพอเหมาะ โดยให้ชิดกับกระดูกอ่อน (Cartilage) มากที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงการตัดกล้ามเนื้อหลอดลม ซึ่งเป็นเหตุให้มีการเสียโลหิต เนื่องจากการตัดผ่านเส้นโลหิตในกล้ามเนื้อ เพราะหลอดลมของหนูขาวมีขนาดเล็กมาก ดังนั้นถ้ามีโลหิตออกเพียงเล็กน้อยอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการอุดตันของทางเดินหายใจได้ จากนั้นสอด Polyethylene cannula ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๒.๕ มิลลิเมตร เข้าหลอดลมในบริเวณที่ผ่าตรงไปยังปอด ผูกด้าย ๒ เส้นที่สอดไว้เพื่อยึด cannula ให้ติดกับหลอดลม ขณะเตรียมสัตว์ทดลองขั้นต่อไป หรือขณะทำการทดลองให้ดูดสิ่งขับแยกจากหลอดลมด้วย Polyethylene cannula ขนาดเล็กที่ต่อกับเข็มและกระบอกฉีดยา (Syringe) เพื่อป้องกันการอุดตันในทางเดินอากาศของระบบหายใจ และช่วยให้การทดลองดำเนินไปด้วยดีโดยตลอด ข้อควรระวังในการดูดสิ่งขับแยกออกจากหลอดลม คือต้องระวังไม่สอด polyethylene cannula ที่ใช้สำหรับดูดสิ่งขับแยกเข้าไปลึกกว่า polyethylene cannula ที่สอดไว้ในหลอดลม เพราะอาจทำให้เกิดบาดแผลถลอก (Irritation) ที่เนื้อเยื่อบุผิวของหลอดลมและปอด

๒.๒.๒.๓ Jugular vein cannulation

ตลอดการทดลองได้ให้เพนโตบาร์บิโทนและสารละลายไดออสคอรีนเข้าทางเส้นโลหิตดำ Jugular ที่บริเวณคอของหนูขาว โดยสอด Polyethylene cannula ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๐.๐๔๘ นิ้ว (Outside diameter) ยาวประมาณ ๑๐ นิ้ว

ภายหลังจากทำ Tracheal cannulation แล้วใช้ปากคีบชนิดที่อแยกเส้นโลหิตดำ Jugular ซึ่งอยู่ที่บริเวณคอใกล้กับไหล่ของหนูขาวออกมาให้ชัดเจน แล้วสอดด้าย ๒ เส้นลอดผ่านใต้เส้นโลหิตดำนี้ ด้ายเส้นที่อยู่ทางด้านหัวใช้ผูกรัดเส้นโลหิตให้แน่น เพื่อป้องกันการไหลกลับของโลหิตดำที่มาจากส่วนหัวของหนู ใช้ปากคีบชนิดที่อหนีบปลายเส้นด้ายดังกล่าวกับผิวหนัง

บริเวณคอของหนูขาว เพื่อให้เส้นโลหิตดำตึงพอเหมาะที่จะสอด Polyethylene cannula จากนั้นใช้กรรไกรขนาดเล็กขลิบผนังเส้นโลหิตดำให้เป็นรูปปากฉลาม สอด cannula ที่ตัดปลายเฉียงและผนให้เรียบเข้าในเส้นโลหิตดำในทิศทางที่ตรงไปยังหัวใจ โดยประมาณว่าให้ปลาย cannula อยู่บริเวณ Superior vena cava เมื่อ cannula อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมแล้ว ผูกด้ายที่เหลืออีกเส้นหนึ่งให้แน่นเพื่อยึด cannula ให้ติดกับเส้นโลหิต ปลายของ cannula อีกข้างหนึ่งต่อกับ Three-way Luer stopcock และ Syringe ซึ่งบรรจุด้วย Normal saline solution (0.9% NaCl solution) โดยปราศจากฟองอากาศ

๒.๒.๒.๔ Carotid artery cannulation

การบันทึกความดันโลหิตของหนูขาวจากเส้นโลหิตแดงคาโรติด (Carotid artery) โดยตรง ด้วยการสอด polyethylene cannula เช่นเดียวกับการทำ Jugular vein cannulation แต่ในกรณีของการทำ Carotid artery cannulation นั้นบรรจุ Heparin saline ๑๐๐ ยูนิตต่อ ๑ มิลลิลิตร ใน Polyethylene cannula, Three-way Luer stopcock และ syringe เพื่อป้องกันการแข็งตัวของโลหิต ซึ่งอาจมีผลต่อการบันทึกความดันโลหิต การสอด cannula นั้นควรพยายามสอดให้อยู่ใกล้ Aorta ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งของ cannula ที่ต่อกับ Three-way Luer stopcock นั้น ให้ต่อเข้ากับ Physiological pressure transducer ซึ่งสัญญาณไฟฟ้าจาก transducer นี้ผ่านเข้าสู่ Grass Model 7 Polygraph บันทึกลงในกระดาษบันทึก เพื่อบันทึกความดันโลหิตทั้ง Systolic pressure และ Diastolic pressure ภายหลังทำ Jugular vein cannulation และ Carotid artery cannulation แล้ว ควรใช้ด้ายที่ผูก cannula กับเส้นโลหิตทั้ง ๒ นั้น เย็บติดกับผิวหนังที่บริเวณใกล้เคียง เพื่อป้องกันการเลื่อนหลุดของ cannula

๒.๒.๒.๕ Electrocardiography

ผลการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจนั้น สังเกตได้โดยการบันทึกคลื่นไฟฟ้าจากหัวใจ (Electrocardiography) แบบ Bipolar limb lead[๔๕] และต่อเข้ากับ Grass Model 7 Polygraph เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงของคลื่นไฟฟ้า จากหัวใจของสัตว์ทดลองลงในกระดาษบันทึก และนับอัตราการเต้นของหัวใจจากการบันทึกดังกล่าว

๒.๒.๒.๕ Recording of Respiratory Movements

การบันทึกอัตราการหายใจของหนูขาว จากแรงกระเพื่อมของ Xyphoid cartilage ขณะที่หายใจ โดยโกนขนหน้าอกบริเวณ Xyphoid cartilage ให้สะอาด กรีดผิวหนังให้เป็นช่องเล็ก ๆ แยกผิวหนังและเนื้อเยื่อต่าง ๆ บริเวณใกล้เคียงจนเห็น Xyphoid cartilage ชัดเจน ใช้เข็มที่ร้อยด้ายแล้วแทงทะลุ Xyphoid cartilage แล้วผูกปลายเส้นด้ายให้แน่นพอควร ปลายอีกข้างหนึ่งของเส้นด้ายต่อเข้ากับ Force displacement transducer เพื่อบันทึกอัตราการหายใจลงบนกระดาษบันทึกของ Grass Model 7 Polygraph

ข้อควรระวังในการเตรียมหนูขาวเพื่อบันทึกอัตราการหายใจ คือไม่ควรกรีดผิวหนังให้กว้างมาก เพราะอาจกรีดถูกเส้นโลหิตบริเวณหน้าอก ซึ่งทำให้หนูขาวเสียโลหิต และถ้าโลหิตออกมากอาจเกิดการแข็งตัวจับกับ Xyphoid cartilage ซึ่งทำให้การบันทึกผลผิดไปจากที่ควรเป็นจริง

๒.๒.๓ ศึกษาผลของไดออสคอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจ, อัตราการเต้นของหัวใจและความดันโลหิตในหนูขาวที่ถูกทำให้เกิดอาการพิษด้วยเพนโตบาร์บิโทน

เตรียมหนูขาวตามข้อ ๒.๒.๒ และทำให้เกิดอาการพิษโดยฉีดเพนโตบาร์บิโทน เข้าทางเส้นโลหิตดำ ครั้งละ ๒๐% ของขนาดยาที่ทำให้หมดความรู้สึกเมื่อแรกเริ่ม (๓๕ มก./กก.นน.ตัว) จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอัตราการหายใจ อัตราการเต้นของหัวใจ และความดันโลหิต ภายหลังฉีดไดออสคอรีนเข้าทางเส้นโลหิตดำด้วยแต่ละขนาด คือ ๘, ๑๖, ๓๒, ๖๔ และ ๑๒๘ มก./กก.นน.ตัว เป็นเวลา ๑ ชั่วโมงในหนูขาวแต่ละกลุ่ม ๆ ละ ๕ ตัว

๒.๒.๔ ศึกษาการแก้อาการพิษที่เกิดจากเพนโตบาร์บิโทนด้วยไดออสคอรีนในหนูถีบจักร

๒.๒.๔.๑ ทำการทดลองเพื่อหาขนาดเพนโตบาร์บิโทนที่ทำให้เกิดอาการพิษพิษจนกระทั่งหนูตาย ๕๐% (Lethal Dose - 50, LD_{50})

เลือกหนูถีบจักรที่มีน้ำหนักระหว่าง ๑๘ - ๒๔ กรัม นำมาเลี้ยงในห้องที่มีเครื่องปรับอากาศ เพื่อควบคุมอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมให้คงที่ เพราะจากการศึกษาของ Forbes และคณะ[๔๗] ได้ยืนยันว่าอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อระยะเวลาการออกฤทธิ์ การทำลาย และการขับยาออกจากร่างกายของยาจำพวกบาร์บิตูเรท หลังจากเลี้ยงหนูในห้องที่มีเครื่องปรับอากาศเป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมงแล้ว ฉีดเพนโตบาร์บิโทนเข้าทางหน้าท้องของหนูถีบจักรที่แบ่งเป็นกลุ่ม ๆ ละ ๖ ตัว ด้วยขนาด ๑๐๐, ๑๑๐, ๑๒๐, ๑๓๐, ๑๔๐ มก./กก.นน.ตัว[๔] โดยแต่ละขนาดให้ฉีดในหนูแต่ละกลุ่ม นับจำนวนหนูตายในแต่ละกลุ่ม ซึ่งกระทำในเวลา ๒๔ ชั่วโมง นำข้อมูลจำนวนการตายของหนูมาคำนวณและเขียนกร๊าฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดที่ให้กับผลที่ทำให้เกิดการตายอันเนื่องมาจากเพนโตบาร์บิโทน จากกร๊าฟที่ได้สามารถหาค่าของ Lethal Dose - 50 ของเพนโตบาร์บิโทน

๒.๒.๔.๒ <u>ทำการทดลองเพื่อดูผลการแก้อาการพิษที่เกิดจากเพนโตบาร์บิโทน ด้วยไดออสคอรีนด้วยขนาด ๑๖ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม โดยการเปรียบเทียบค่า Lethal Dose-50</u>

การคัดเลือกและการเตรียมหนูถีบจักรทำเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ ๒.๒.๔.๑ จากนั้นแบ่งหนูถีบจักรออกเป็น ๖ กลุ่ม ๆ ละ ๖ ตัว ในแต่ละกลุ่มถูกทำให้เกิดอาการพิษโดยฉีดเพนโตบาร์บิโทนเข้าทางหน้าท้องในขนาด ๑๒๐, ๑๓๐, ๑๔๐, ๑๕๐, ๑๖๐, ๑๗๐ มก./กก.นน.ตัว ตามลำดับ ภายหลังจากให้เพนโตบาร์บิโทนเป็นเวลา ๓ นาทีแล้ว จึงฉีดไดออสคอรีนเข้าทางหน้าท้องด้วยขนาด ๑๖ มก./กก.นน.ตัว ในหนูถีบจักรทุกกลุ่ม นับจำนวนหนูตายในแต่ละกลุ่มซึ่งกระทำในเวลา ๒๔ ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้หาค่า Lethal Dose - 50 จากการคำนวณและเขียนกร๊าฟเหมือนในหัวข้อที่ ๒.๒.๔.๑

๒.๒.๔.๓ <u>ทำการทดลองเพื่อดูผลการแก้อาการพิษที่เกิดจากเพนโตบาร์บิโทน ด้วยไดออสคอรีนขนาด ๓๒ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม โดยการเปรียบเทียบค่า Lethal Dose - 50</u>

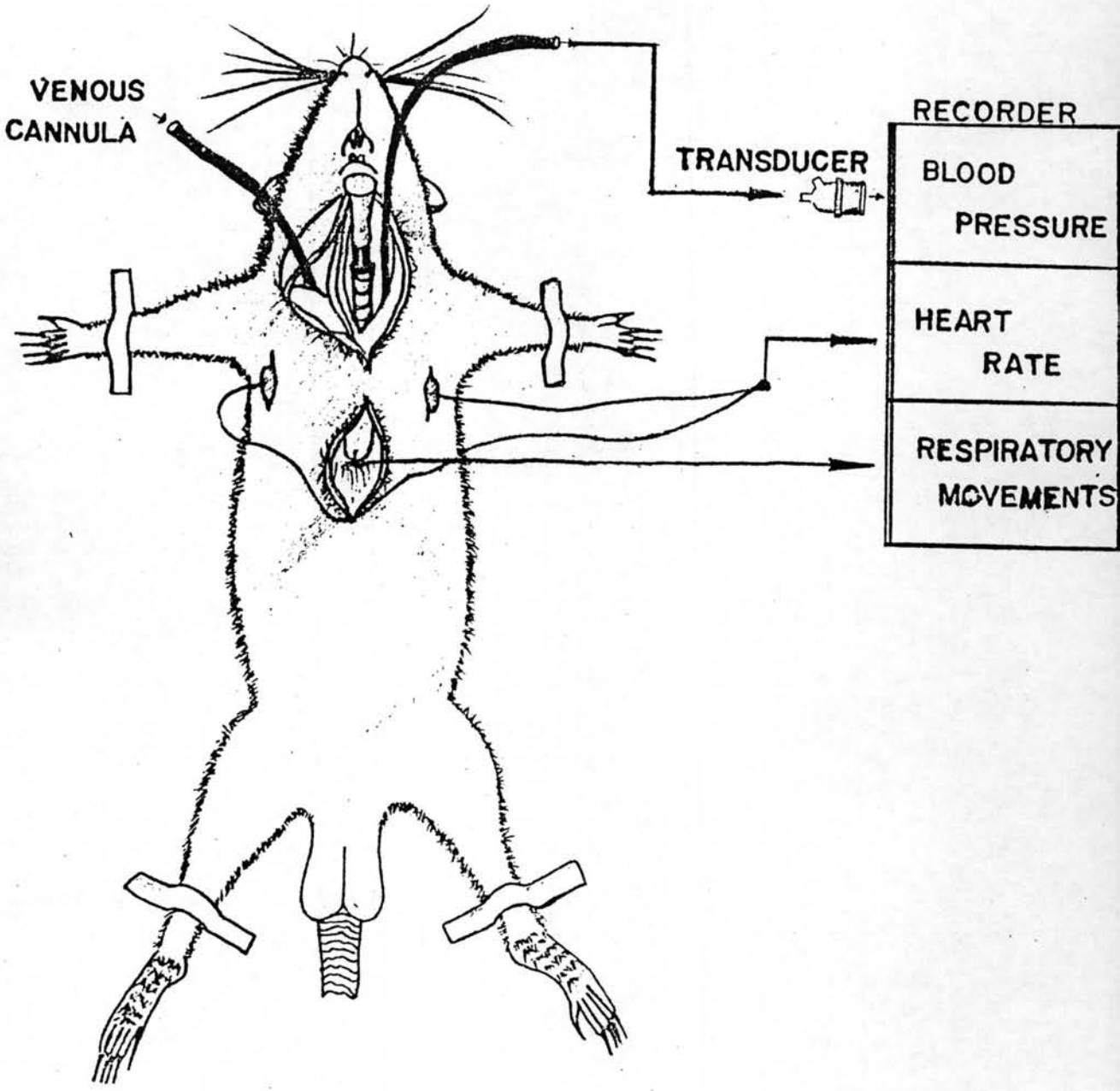
ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ ๒.๒.๔.๒ โดยทำให้หนูถีบจักรเกิดอาการพิษจากเพนโตบาร์บิโทนขนาด ๑๒๐, ๑๓๐, ๑๔๐, ๑๕๐, ๑๖๐, ๑๗๐ มก./กก.นน.ตัว

หลังจากนั้น ๓ นาทีจึงให้ไดออสคอรีนขนาด ๓๒ มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก ๑ กิโลกรัม เพื่อแก้อาการพิษดังกล่าว แล้วนับจำนวนหนูตายในแต่ละกลุ่มซึ่งกระทำใน ๒๔ ชั่วโมง หาค่า Lethal Dose - 50 ตามวิธีในหัวข้อ ๒.๒.๔.๑

๒.๒.๔.๔ <u>ทำการทดลองเพื่อดูผลการแก้อาการพิษที่เกิดจากเพนโตบาร์-บิโทน ด้วยไดออสคอรีนขนาด ๖๔ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม โดยการเปรียบเทียบค่า Lethal Dose - 50</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อที่ ๒.๒.๔.๒ แต่ขนาดของเพนโตบาร์บิโทนที่ทำให้เกิดอาการพิษในหนูถีบจักรนั้นใช้ขนาด ๑๔๐, ๑๕๐, ๑๖๐, ๑๗๐, ๑๘๐, ๑๙๐ มก./กก.นน.ตัว และแก้อาการพิษด้วยไดออสคอรีนขนาด ๖๔ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม นับจำนวนหนูตายในแต่ละกลุ่มซึ่งกระทำใน ๒๔ ชั่วโมง แล้วหาค่าของ Lathal Dose - 50 ตามวิธีในหัวข้อที่ ๒.๒.๔.๑

การเลือกใช้ไดออสคอรีนขนาด ๑๖, ๓๒, และ ๖๔ มก./กก.นน.ตัว นั้นได้ข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองในหนูขาวดังกล่าวข้างต้น



รูปที่ ๑ แสดงการเตรียมหนูขาว โดยการทำ Tracheal cannulation, Carotid artery และ Jugular vein cannulation, Electrocardiography และเตรียม Xyphoid cartilage เพื่อดู Respiratory movement