บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีและแผนดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาการเกิด acute toxicity และ convulsant activity ของ barakol
2. ศึกษา sedative action ของ barakol
3. ศึกษาการต้านฤทธิ์ที่เกิดขึ้นระหว่าง barakol กับยากระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง
4. ศึกษาฤทธิ์ในการระงับความเจ็บปวด(analgesic activity) ของ barakol
5. ศึกษาฤทธิ์ของ barakol ต่อระบบ serotonergic system
6. ศึกษาฤทธิ์ของ barakol ต่อระบบ dopaminergic system

1. การศึกษา acute toxicity และ convulsant activity ของ barakol

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรเพศผู้ (mice) พันธุ์สวิส สุขภาพสมบูรณ์ น้ำหนักประมาณ 23-28 กรัม แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว

1.2 วิธีดำเนินการทดลอง

นำหนูแต่ละกลุ่มมาฉีด barakol ทางหน้าท้อง(intraperitoneal injection) ขนาดต่างๆกัน คือ 225 ,275 ,325 , 375 และ 425 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม ต่อจากนั้นก็นับจำนวนหนูถีบจักรที่แสดงอาการชักในเวลา 2 ชั่วโมง และ จำนวนหนูถีบจักรที่ตายในแต่ละกลุ่มภายในเวลา 48 ชั่วโมง

1.3 การแปรผลการทดลอง

แปรผลการทดลองโดยการคำนวนหาค่า convulsant dose-50 (CD_{50}) และ

Lethal dose-50 (LD_{50})ของ barakol ด้วยวิธีการคำนวนตามแบบของ Litchfild และ Wilcoxon (1949).

2.ทำการศึกษา sedative action ของ barakol

2.1.สัตว์ทดลอง

ใช้หนูถีบจักรเพศผู้ พันธุ์สวิส น้ำหนัก 23-28 กรัม แบ่งเป็นกลุ่มๆละ 5 ตัว

2.2.เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

นำเครื่องมือวัดการเคลื่อนไหว (locomotor activity) ที่ชื่อว่า "Animal activity locomotor monitor" มาวัดการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลอง โดยที่เครื่องนี้ประกอบด้วยกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 40x40x20 ซม. ที่ 2 ข้างของกล่องจะประกอบด้วย Photoelectric cell จำนวน 8 ดวง เรียงเป็นแถวระดับเดียวกัน ทางด้านตรงข้ามกับ photoelectric cells จะมีดวงไฟส่องแสง infrared ซึ่งมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า มาตกลงบน photoelectric cells แต่ละหน่วย เมื่อมีการบังลำแสงแต่ละลำ จะเกิดการบันทึกโดยการรับรู้ของ photoelectric cells โดยอัตโนมัติ ทำให้เกิดเป็นสัญญาณห้วงไฟฟ้าซึ่งนำไปนับและบันทึกใช้โดยออกมาเป็นจำนวนเท่ากับการบังลำแสงนั้น ห่วงเวลา(epoch) ของการนับแต่ละห่วง สามารถควบคุมได้โดย timer ที่สร้างภายในเครื่อง

2.3.วิธีดำเนินการวิจัย

การทำการทดลองนี้จะทำเวลาเดียวกันทุกวัน คือ 7.30-10.30 น. เนื่องจากเป็นช่วงที่หนูมี activity มากที่สุด และหลังจากเวลานี้ หนูจะหมอบพัก และมี activity น้อยลง ในขั้นแรกจะนำหนูมาวางในเครื่องมือทดลองนี้ก่อนเริ่มการทดลอง 30 นาที เพื่อให้หนูได้มีโอกาสปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมใหม่ โดยจะฉีด isotonic saline solution ทางหน้าท้อง และ record จำนวนการเคลื่อนไหวทุก 5 นาทีและสามารถแบ่งหนูออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามอัตราการเคลื่อนไหวของมัน คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีอัตราการเคลื่อนไหวน้อย (Low activity group) โดยมี

อัตราการเคลื่อนไหวตลอด 2 ชม. น้อยกว่า 500 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีอัตราการเคลื่อนไหวปานกลาง (Medium activity group) โดยมีอัตราการเคลื่อนไหวตลอด 2 ชม. เท่ากับ 500-1,500 ครั้ง

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีอัตราการเคลื่อนไหวมาก (High activity group) โดยมีอัตราการเคลื่อนไหวตลอด 2 ชม. มากกว่า 1,500 ครั้ง

หนู mice ส่วนใหญ่แล้วจะมี activity ในกลุ่มที่ 2 คือ มี activity ปานกลาง (Medium activity group) สำหรับการตรวจสอบผลของ barakol ต่อ locomotor behavior นี้ จึงใช้หนูกลุ่ม medium activity โดยทำการทดลองหนู mice แต่ละตัวเป็นเวลา 2 วัน วันละ 2 ชม. คือ

วันที่ 1 จะนำหนู mice มาฉีด isotonic saline solution ทางหน้าท้อง และ บันทึกจำนวนการเคลื่อนไหวทุก 5 นาที เป็นเวลา 2 ชม. เพื่อแยกเอาหนูที่มี medium activity group เฉพาะ มาทำการทดลองในวันที่ 2

วันที่ 2 นำหนูที่ทดลองในวันที่ 1 เฉพาะที่อยู่ในกลุ่ม medium activity แบ่งออกเป็นกลุ่มๆละ 5 ตัว และฉีด barakol ทางหน้าท้องแต่ละกลุ่มในขนาดต่างๆกัน คือ 10,25,50,75,100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และบันทึก locomotor behavior เช่นเดียวกับวันที่ 1

หลังจากนั้นก็ทำการทดลองผลของ barakol ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่มีผลต่อกลุ่มต่างๆทั้ง 3 กลุ่ม ดังวิธีการเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น

2.4 การตรวจสอบทางสถิติ

ค่าของผลการทดลองออกมาเป็นค่า Mean ± Standard error of mean (S.E.M.) และใช้ Student's t-Test หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม control และ กลุ่มทดลอง โดยให้ค่า $P < 0.05$

014208

3. การศึกษาการต้านฤทธิ์ที่เกิดขึ้นระหว่าง barakol กับยากระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูถีบจักร พันธุ์สวิส ที่มีน้ำหนัก 23-28 กรัม แบ่งเป็นกลุ่มๆละ 8 ตัว

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 นำหนูทดลองแต่ละกลุ่มมาฉีด CNS stimulating agents 3 ชนิด คือ Picrotoxin, Bicucullin, Strychnine ทางหน้าท้อง แล้วนับจำนวนหนูที่แสดงอาการชักภายใน 2 ชั่วโมง และหนูที่ตายในแต่ละกลุ่มภายในเวลา 48 ชั่วโมง โดยขนาดของยาที่ใช้ คือ

ใช้ Picrotoxin ขนาด 2, 4, 6, 8, 10, 12 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ใช้ bicucullin ขนาด 3, 4, 5, 6, 7 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ใช้ Strychnine ขนาด 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

3.2.2 Pretreatment ด้วย barakol ในขนาด 5, 10, 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ก่อนการให้ picrotoxin ,bicucullin ,strychnine 15 นาที แล้วนำมาเปรียบเทียบกับการทดลองในข้อ 3.2.1 ที่ทำไว้

3.3 การแปรผลการทดลอง

แปรผลโดยการคำนวนหาค่า CD_{50} และ LD_{50} ของ picrotoxin, bicucullin และ strychnine ทั้งก่อนและหลังการ pretreatment ด้วย barakol ตามวิธีการของ Lichfield และ Wilcoxon (1949)

4. ศึกษาฤทธิ์ในการระงับความเจ็บปวดของ barakol

4.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูถีบจักร พันธ์สวิส ที่มีน้ำหนัก 23-28 กรัม จำนวน 40 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว

4.2 วิธีการวัด nociceptive threshold

การหา base line ของ nociceptive threshold จะใช้การทดสอบด้วย hot plate test โดยวางหนูลงบนแผ่นโลหะความร้อน (Thermostatically heated metal plate) ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 52° ± 1 °C และครอบปิดด้วยกล่องพลาสติกขนาด 15x15x22 ซม. เพื่อกันหนูกระโดดหนี และสามารถสังเกตอาการต่างๆของหนูได้ และจะบันทึกเวลาการตอบสนองของหนูเป็นวินาทีเมื่อวางหนูลงบนแผ่นโลหะแล้วเกิดอาการต่างๆ คือ การที่หนูแสดงอาการเลียเท้าหน้า, อาการกระวนกระวาย, เท้าหลังอยู่นิ่งไม่ได้, กระโดดหนี ถือว่าเป็น endpoints และใช้เวลา cut - off time เท่ากับ 60 วินาที ส่วนการทดลองนั้นจะทำ control latency 1 วันก่อนการทดลอง

4.3 วิธีการหา nociceptive threshold

หนูที่จะทำการทดลองนั้นนำมาฉีด isotonic saline solution ทางหน้าท้องและวัด nociceptive threshold ทันที หลังจากนั้นจะวัด nociceptive threshold เป็นระยะหลังฉีด isotonic saline คือ 5, 15, 30, 60, 90 นาที เพื่อเป็น base line nociceptive threshold 1 วันก่อนการทดลอง

วันต่อมานำหนูเหล่านี้มาฉีด barakol ทางหน้าท้อง ในขนาดต่างๆกันแต่ละกลุ่ม คือ 100, 125, 150, 175 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยใช้การทดสอบ nociceptive threshold แบบเดียวกันกับที่กล่าวข้างต้น

4.4 การตรวจสอบทางสถิติ

ผลการทดลองออกมาเป็นค่าของ mean latency ± S.E.M. ใช้ Student's t-Test ที่มีค่า $P < 0.05$

5.ผลของ barakol ต่อระบบ Serotonergic system

5.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักอยู่ระหว่าง 230 - 260 กรัม โดยแบ่งเป็นกลุ่มๆละ 5 ตัว

5.2 วิธีการศึกษาการสบัดหัวและกลุ่มอาการ 5-HT Syndrome (head shake behavior และ 5-HT Syndrome)

ใช้ 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) ตามที่มีรายงานข้างต้นไว้ว่าสามารถทำให้เกิด head shake behavior และ 5-HT syndrome มาฉีดหนูทางหน้าท้องในขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และนำไปวางลงบนกาละมัง (bowl) รูปครึ่งทรงกลม และสังเกตพฤติกรรมการสบัดหัว และ 5-HT syndrome 2 ชั่วโมงเพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

7 วันต่อมานำหนูกลุ่มควบคุมมาทดลองให้ barakol ก่อนให้ 5-HT 200 มิลลิกรัม 15 นาที ในขนาดต่างๆกันแต่ละกลุ่ม คือ 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และสังเกต head shake behavior และ 5-HT syndrome เช่นเดียวกัน

5.3 ผลการตรวจสอบทางสถิติ

ผลการทดลองออกมาเป็นค่าของ mean head shakes of animals $\pm$ S.E.M. และหาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ 2 tail Student's t-Test ที่ 95 % confidence limit มีค่า P = 0.05

6. ผลของ barakol ต่อระบบ dopaminergic system

6.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว พันธุ์ Wistar เพศผู้ที่มีน้ำหนักขณะทำ stereotaxic operation เท่ากับ 280-320 กรัม และตลอดเวลาการทดลอง หนู rat จะมีน้ำหนักถึง 340-360 กรัม

6.2 วิธีการทดลอง

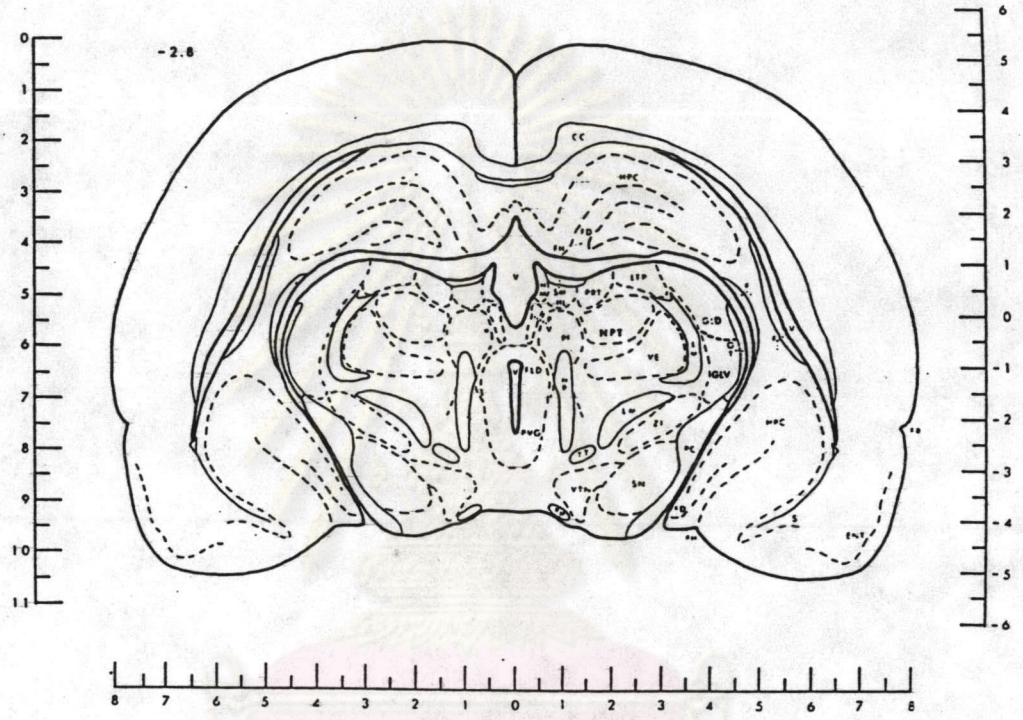
ทำลาย dopamine nerve cell ใน substantia nigra ข้างซ้ายด้วย 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) ซึ่งเป็น DA neurotoxin ทำให้หนูสลบด้วยการฉีด pentobarbital sodium 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางหน้าท้อง แล้วนำหัวหนูมาตรึงที่ stereotaxic head holder (Takahashi stereotaxic instrument) หลังจากนั้นทำการฉีด 6-OHDA เข้า left substantia nigra (SN) โดยใช้ microsyringe (Hamilton syringe) เข้าสู่ตำแหน่งโดย stereotaxic carrier โดยจุดที่ฉีดมี co-ordinate ที่ 3.33 มิลลิเมตร หลังรอยต่อ bregma 2.7 มิลลิเมตร จาก midline 8.3 มิลลิเมตร ต่ำจาก dura mater ตาม stereotaxic atlas of the rat brain ของ Pellegrino และ Cushman 1977, รูปที่ 4 6-OHDA ที่ฉีดนั้นจะละลายในน้ำเกลือ 0.9 % ปริมาณ 4 ml โดยมี ascorbic acid เป็น preservative ละลายอยู่ประมาณ 0.2 มิลลิกรัม ต่อ น้ำเกลือ 100 มิลลิลิตร สารละลายต้องเย็นและเตรียมใหม่ทุกครั้ง และฉีดในอัตรา 1 ml/min. ปล่อยทิ้งไว้ 5 นาที จึงค่อยๆถอนปลายเข็มจากตำแหน่งที่ฉีดอย่างช้าๆ เย็บปิดรอยแผลเลี้ยงหนูไว้ 1 อาทิตย์ จึงนำมาทดสอบด้วยการฉีด apomorphine(i.p.) ขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

6.3 การบันทึกพฤติกรรมการหมุน

นำหนูหลังทำ lesion 7 วัน มาฉีด apomorphine ทางหน้าท้อง ขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม นำหนูไปวางบนภาละมังครึ่งทรงกลม (bowl) และนับจำนวนการหมุนทุกๆ 10 นาที จนถึง 2 ชั่วโมง เป็นกลุ่มควบคุม 7 วันต่อมานำหนูกลุ่มเดิมนี้มา pretreatment ด้วย barakol แต่ละกลุ่มในขนาดต่างๆกัน คือ 75, 100, 125, และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ 15 นาทีก่อนการฉีด apomorphine 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และบันทึกพฤติกรรมการหมุนเช่นเดียวกัน

6.4 การทดสอบทางสถิติ

ผลการทดลองออกมาเป็นค่าของ mean rotation of animal $\pm$ S.E.M. ใช้ Student's t-Test ตรวจสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95 % confidence limits ที่มีค่า $P < 0.05$



รูปที่ 5 Standard diagram sections of the rat brain showing location of the substantia nigra from Pellagrino and Cushman allas of the rat brain.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย