บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

2.1 วัสดุ, สัตว์ทดลองและเครื่องมือ

2.1.1 ไดออสคอรีน เบส (เป็นสารเหนียว ๆ สีเหลืองเข้ม สารนี้ดูดความชื้นได้ดีดังนั้นจึงต้องเก็บไว้ใน desiccator ตลอดเวลา) และไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์ ซึ่งสกัดได้จากหัวกลอยตามวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Pavovat, 1973 และผ่านการทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ แล้ว

2.1.2 เคมีภัณฑ์

2.1.2.1 sodium pentobarbitone injection USP (Nembutal Sodium, Abbott, 50 mg/cc)

2.1.2.2 bemegride (megimide; nicholas proprietary Limited, 5 mg/cc)

2.1.2.3 picrotoxin (B.D.H. Laboratory Made in England)

2.1.2.4 0.9% sodium chloride (0.9% NSS)

2.1.2.5 Heparin (Leo. Pharmaceutical Products Ballerup-Denmark, 5,000 $\bar{U}$ /cc)

2.1.2.6 1% xylocaine [Lepetit (Thailand) Co., Ltd]

2.1.2.7 น้ำกลั่น

2.1.3 สัตว์ทดลอง

2.1.3.1 หนูถีบจักร (mice) เพศผู้ สุขภาพสมบูรณ์ พันธุ์สวิสและพันธุ์ออสเตรเลีย (CD_1) น้ำหนักระหว่าง 16-35 กรัม

2.1.3.2 หนูขาว (rat) สุขภาพสมบูรณ์ พันธุ์ Wistar น้ำหนักระหว่าง 150-300 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.4 เครื่องมือ

2.1.4.1 polygraph recorder, 4 channels, Grass Model 79 C

ช่อง 1 ใช้บันทึก EKG (preamplifier model 7P8CD)

ช่อง 2 ใช้บันทึกการหายใจ (preamplifier model 7PIE Input DC 20K)

ช่อง 3 ความดันโลหิต (preamplifier model 7PIE Input Brigde 2K)

ช่อง 4 ใช้บันทึกคลื่นสมอง (preamplifier model 7PIDE Input TC-1)

2.1.4.2 subdermal needle electrode สำหรับ EKG

2.1.4.3 statham pressure transducer (Model No.7, Hato Rey, Puertorico)

2.1.4.4 thermocouple transducer

2.1.4.5 electrocorticographic electrode ชนิด silver-silver chloride electrode ชนิดเดี่ยวและชนิดคู่ (diameter 1 mm)

2.1.4.6 polyethylene tracheal canula เส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 2.5 มม.

2.1.4.7 polyethylene canula สำหรับ vein เส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 0.965 มม. และสำหรับ artery เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.27 มม.

2.1.4.8 เครื่องมือผ่าตัด 1 ชุด

2.1.4.9 shielding cage

2.1.4.10 stereotaxic headholder

2.1.4.11 dental drill, electric

2.1.4.12 bone wax

2.1.4.13 stand สำหรับจับ electrode

2.1.4.14 infusion pump (Harvard Apparatus Co. Inc)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.4.15 electronic counter สำหรับนับอัตราการหายใจ

2.1.4.16 scalp vein No. 25

2.1.4.17 กรงยึดหนูสำหรับใส่หนูในขณะให้ยาทางเส้นโลหิตดำที่หาง

2.2 วิธีทำการวิจัย

2.2.1 ศึกษา acute toxicity, convulsant activity ของไดออสคอรีน เบส เปรียบเทียบกับ เบมีไกรด์และพิโครท็อกซินในสัตว์ทดลองปกติซึ่งคงความสามารถในการรับรู้ (conscious animal)

2.2.1.1 ทำการทดลองเพื่อหาขนาดของไดออสคอรีน เบส, เบมีไกรด์ และพิโครท็อกซินที่ทำให้หนูถีบจักรจำนวนครึ่งหนึ่งของทั้งหมดเกิดอาการชัก (convulsant dose-50, CD_{50}) และขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรจำนวนครึ่งหนึ่งของทั้งหมดเกิดอาการพิษจนกระทั่งหนูตาย (lethal dose-50, LD_{50})

ในการดำเนินการทดลองใช้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 16-30 กรัมฉีดไดออสคอรีน เบส (ความเข้มข้น 4 มก./มล. ละลายในน้ำกลั่น) ด้วยขนาด 38, 40,42,44,46,48,50 และ 60 มก./กก.นน.ตัว เข้าทางช่องท้องหนูพันธุ์ออสเตรเลีย (CD_1) โดยแบ่งหนูออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 12 ตัว ไดออสคอรีน เบสแต่ละขนาดให้ฉีดในหนูแต่ละกลุ่ม ฉีดเบมีไกรด์ (ความเข้มข้น 3 มก./มล., ละลายใน 0.9% sodium chloride) ขนาด 14,17,20,23,30,35,40 และ 45 มก./กก.นน.ตัว และพิโครท็อกซิน (ความเข้มข้น 0.5 มก./มล., ละลายในน้ำกลั่น) ขนาด 2,4,6,8,10 และ 12 มก./กก.นน.ตัว เข้าทางช่องท้องหนูพันธุ์สวิสโดยแต่ละขนาดให้ฉีดในหนูแต่ละกลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว จากนั้นนับจำนวนหนูที่เกิดอาการชักทั้งแบบ clonic seizure และ/หรือ tonic seizure โดยกระทำในเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนหนูถีบจักรที่ตายในแต่ละกลุ่มภายในเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำข้อมูลจำนวนหนูถีบจักรที่เกิดอาการชัก และตายมาคำนวณและเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดที่ให้กับผลที่ทำให้เกิดอาการชักและตายอันเนื่องมาจากไดออสคอรีน เบส, เบมีไกรด์ และพิโครท็อกซิน จากกราฟที่ได้นำมาหาค่า CD_{50} และ LD_{50} ของอะนาเลปติคทั้ง 3 ตามวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949) โดยวิธีการที่ได้แสดงไว้ในภาคผลการวิจัย

2.2.1.2 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมต่าง ๆ อาการชักและตายโดยละเอียดซึ่งกระทำทันทีหลังจากฉีดอะนาเลปติคทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวไว้ในข้อ 2.2.1.1 การสังเกตกระทำทันทีหลังฉีดติดต่อกันเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

2.2.2 ศึกษา therapeutic index ของไดออสคอรีน เบส เปรียบเทียบกับเบมีไกรด์ และพิโครท็อกซิน

ทำการทดลองหาข้อมูลอัตราส่วนของ convulsant dose ต่อ respiratory stimulant dose ของไดออสคอรีน เบส เปรียบเทียบกับเบมีไกรด์และพิโครท็อกซินโดยใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Luscombe และ Nicholls (1971) ใช้หนูถีบจักรเพศผู้พันธุ์สวิสน้ำหนัก 27-35 กรัม แบ่งหนูเป็น 3 กลุ่มๆละ 6 ตัว ฉีดอะนาเลปติคทั้ง 3 ชนิดคือไดออสคอรีน เบส ความเข้มข้น 3 มก./มล.(ในน้ำกลั่น), เบมีไกรด์ความเข้มข้น 1 มก./มล.(ใน 0.9% NSS) และพิโครท็อกซิน 1 มก./มล.(ในน้ำกลั่น) เข้าทางเส้นโลหิตดำที่หางของหนูถีบจักรแต่ละกลุ่ม [ความเข้มข้นของอะนาเลปติคที่ใช้สำหรับเข้าทางเส้นโลหิตดำนี้เป็นความเข้มข้นที่ให้ปริมาตรของอะนาเลปติคทั้ง 3 ในขณะที่มีผลในการกระตุ้นการหายใจ (respiratory stimulant effect) ใกล้เคียงกัน]

วิธีการให้ยาทางเส้นโลหิตดำที่หางของหนูถีบจักรทำโดย นำหนูถีบจักรใส่ในกรงหนูยึดหนูให้หางโผล่ออกมานอกกรง ฉีด 1% xylocaine เข้าใต้ผิวหนังบริเวณปลายหางหนูในขนาดที่น้อยที่สุดจากนั้นนำหางไปแช่ในน้ำอุ่นประมาณ 45-50°C เพื่อให้เส้นโลหิตขยายตัว หลังจากที่หางหนูชา, เส้นโลหิตขยายตัวและหนูไม่ดิ้นเต้นแล้ว ใช้นิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือจับปลายหางหนู ใช้มืออีกข้างฉีดยาเข้าทางเส้นโลหิตดำโดยใช้ scalp vein No. 25 ที่ต่อกับกระบอกฉีดยาซึ่งไล่อากาศออกให้หมดแล้ว กระบอกฉีดนี้ถูกควบคุมโดย infusion pump เมื่อเข็มอยู่ในเส้นโลหิตดีแล้วจะเห็นเลือดพุ่งออกมาอยู่ใน scalp vein ถ้าเข็มไม่อยู่ในเส้นโลหิตเวลาฉีดยาจะเห็นรอยขาวซีด ๆ บริเวณใกล้ ๆ กับปลายเข็ม เมื่อทำการฉีดเปิดเครื่อง infusion pump ในอัตราเร็ว 0.10 มล./นาที จนกระทั่งหนูถีบจักรเกิดอาการชัก clonic และ/หรือ tonic convulsion) ขนาดของยาที่ทำให้เกิด "minimal respiratory stimulant" นั้นสังเกตได้จากการที่หนูถีบจักรมีการ

เพิ่ม ventilation และ/หรือมีการเพิ่มอัตราการหายใจอย่างน้อย 40 ครั้ง/นาทีโดยนับด้วย electronic counter จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนของ convulsant dose (CD) ต่อ respiratory stimulant dose (RD) ใช้ mean ทางสถิติในการคำนวณ

2.2.3 ศึกษาการต้านฤทธิ์ (antagonism) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างเพนโตบาร์บิโทนและอะนาเลปติคทั้ง 3 ชนิด

2.2.3.1 ทำการทดลองเพื่อหา sleeping time ของเพนโตบาร์บิโทนโดยการใช้หนูถีบจักรเพศผู้ พันธุ์สวิส [ใช้หนูเพศเดียวกันเนื่องจาก Westfall และคณะ (1964) พบว่า male albino mice จะมี sleeping time มากกว่า female albino mice เมื่อให้เพนโตบาร์บิโทนในขนาดที่เท่า ๆ กัน และใช้หนูพันธุ์เดียวกันเนื่องจาก Jay (1955) พบว่าหนูถีบจักรพันธุ์ต่าง ๆ กัน (inbred และ non-inbred) จะมี sleeping time แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อให้ hexobarbital ในขนาดที่เท่ากัน] น้ำหนัก 25-35 กรัม นำมาทดลองในห้องที่มีเครื่องปรับอากาศอุณหภูมิประมาณ $70^{\circ}F$ แบ่งหนูเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัวทุกกลุ่มจะได้รับเพนโตบาร์บิโทนขนาด 50 มก./กก.นน.ตัว [ความเข้มข้น 10 มก./มก.] เข้าทางช่องท้อง จากนั้นสังเกต right reflex ซึ่งทดสอบโดยการจับหนูถีบจักรนอนหงาย ถ้าหนูไม่สามารถกลับตัวได้ 3 ครั้งติดต่อกันถือว่าเสีย right reflex เมื่อหนูเสีย right reflex จึงฉีด 0.9% NSS ขนาด 0.25 ซีซี, ไดออสคอรีน เบส ขนาด 39 มก./กก.นน.ตัว (CD_{50}) (ความเข้มข้น 4 มก./มล.), เบมีไกรด์ ขนาด 16 มก./กก.นน.ตัว (ความเข้มข้น 3 มก./มล.) และพิโครท็อกซินขนาด 4.9 มก./กก.นน.ตัว (CD_{50}) (ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.) เข้าทางช่องท้องของหนูถีบจักรแต่ละกลุ่มตามลำดับ จากนั้นบันทึก sleeping time ของหนูถีบจักรโดยนับเวลาตั้งแต่หนูถีบจักรเสีย right reflex จนกระทั่ง right reflex กลับคืนมา ซึ่งทดสอบโดยการจับหนูนอนหงาย ถ้าสามารถกลับตัวได้ 3 ครั้งติดต่อกันถือว่ามี right reflex สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลองนี้ใช้ unpaired t-test

2.2.3.2 ศึกษาการแก้อาการพิษที่เกิดจากเพนโตบาร์บิโทนด้วยไดออสคอรีนเบส, เบมีไกรด์และพิโครท็อกซินในหนูถีบจักร

2.2.3.2.1 ทำการทดลองเพื่อหาขนาดเพนโตบาร์บิโทน ที่ทำให้เกิดอาการพิษจนกระทั่งหนูตาย 50% (lethal dose-50, LD_{50})

ทำการทดลองโดยใช้หนูถีบจักรเพศผู้ พันธุ์สวิส น้ำหนักระหว่าง 20-30 กรัม นำมาเลี้ยงและทดลองในอุณหภูมิห้อง ฉีดเพนโตบาร์บิโทนเข้าทางหน้าท้องของหนูถีบจักรที่แบ่งเป็นกลุ่ม ๆ ละ 6 ตัวด้วยขนาด 80,100,120,140 และ 160 มก./กก.นน.ตัว โดยแต่ละขนาดฉีดในหนูแต่ละกลุ่มนับจำนวนหนูตายในแต่ละกลุ่มในเวลา 24 ชั่วโมง นำข้อมูลจำนวนการตายของหนูมาคำนวณและเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดที่ให้กับผลที่ทำให้เกิดการตายอันเนื่องจากเพนโตบาร์บิโทนจากกราฟที่ได้สามารถหาค่า LD_{50} ของเพนโตบาร์บิโทนตามวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949)

2.2.3.2.2 ทำการทดลองเพื่อดูผลการแก้อาการพิษที่เกิดจากเพนโตบาร์บิโทนด้วยไดออสคอรีน เบส, เบมีไกรด์ และพิโครท็อกซินขนาด LD_{50} คือ 42.5 33 และ 9 มก./กก.นน.ตัว โดยการเปรียบเทียบค่า LD_{50}

การคัดเลือกและการเตรียมหนูถีบจักรทำเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ 2.2.3.2.1 จากนั้นแบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 3 พวก ๆ ละ 4 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว โดยพวกที่ให้ไดออสคอรีน เบส แก้อาการพิษของเพนโตบาร์บิโทนจะได้รับเพนโตบาร์บิโทนเข้าทางช่องหน้าท้องในหนูแต่ละกลุ่มด้วยขนาด 120,130,140,150 และ 160 มก./กก.นน.ตัว ส่วนหนูอีก 2 พวกจะได้รับเพนโตบาร์บิโทนเข้าทางหน้าท้องในหนูแต่ละกลุ่มด้วยขนาด 100,120,140 และ 160 มก./กก.นน.ตัว ตามลำดับ ภายหลังจากให้เพนโตบาร์บิโทนเป็นเวลา 2 นาทีแล้วจึงฉีดไดออสคอรีน เบส, เบมีไกรด์ และพิโครท็อกซินเข้าทางหน้าท้องด้วยขนาด LD_{50} คือ 42.5, 33 และ 9 มก./กก.นน.ตัว ในหนูถีบจักรแต่ละพวกตามลำดับ นับจำนวนหนูตายในแต่ละพวกซึ่งกระทำในเวลา 24 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้จากหนูแต่ละพวกมาหาค่า LD_{50} จากการคำนวณและเขียนกราฟเหมือนในหัวข้อที่ 2.2.3.2.1

2.2.4 ศึกษาปฏิกิริยาต่อกันระหว่างเพนโตบาร์บิโทน กับไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์ ในหนูขาวเปรียบเทียบกับเบมีไกรด์และพิโครท็อกซินโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอัตราการหายใจ, อัตราการเต้นของหัวใจ, ความดันโลหิต, คลื่นสมองและการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น

2.2.4.1 ศึกษาปฏิกิริยาต่อกันระหว่างเพนโตบาร์บิโทนกับไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์ เปรียบเทียบกับเบมีไกรด์และพิโครท็อกซินในหนูขาวที่ถูกทำให้เกิดอาการพิษจากเพนโตบาร์บิโทนจนกระทั่งหยุดหายใจ

2.2.4.1.1 น้ำหนูขาวเพศผู้ พันธุ์ Wistar น้ำหนักระหว่าง 150-300 กรัม แบ่งหนู 4 กลุ่มดังนี้คือ 1. กลุ่มควบคุม เป็นหนูขาวที่ได้รับเพนโตบาร์บิโทนอย่างเดียว 2. กลุ่มหนูขาวที่ได้รับเพนโตบาร์บิโทนและไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์ ในขนาด 16,32 และ 64 มก./กก.นน.ตัว 3. กลุ่มหนูขาวที่ได้รับเพนโตบาร์บิโทนและเบมีไกรด์ ในขนาด 16,32 และ 64 มก./กก.นน.ตัว 4. กลุ่มหนูขาวที่ได้รับเพนโตบาร์บิโทนและพิโครท็อกซินในขนาด 4.4 มก./กก.นน.ตัว ใช้หนูขาว 5 ตัวในหนูแต่ละกลุ่ม และหนูที่ได้รับอะนาเลปติคแต่ละขนาด [จากการทดลองหาขนาดของสารเหล่านี้ พบว่า ไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์, เบมีไกรด์ ขนาด 16 มก./กก.นน.ตัว และพิโครท็อกซินขนาด 4.4 มก.กก.นน.ตัว เป็นขนาดที่น้อยที่สุดที่สามารถแก้อาการพิษของเพนโตบาร์บิโทนได้]

2.2.4.1.2 anesthesia ทำให้หนูขาวหมดความรู้สึกโดยฉีดเพนโตบาร์บิโทนขนาด 45 มก./กก.นน.ตัว [Russell และ David, 1977] เข้าทางช่องท้อง ในระหว่างเตรียมสัตว์ทดลอง ๆ อาจฟื้นจากระดับความลึกของการสลบระดับที่ 3 [คือมีการหายใจสม่ำเสมอ, การตอบสนองต่อการเจ็บปวดอาจเกิดโดยการเพิ่ม pulmonary ventilation , ไม่มี corneal reflex, eye ball roll downward และต่อมา eye ball จะ fix อยู่ตรงกลาง, pupil constrict ต่อมาจะ dilute อย่างช้า ๆ]เข้าสู่ระดับที่ 2 [คือมี loss of consciousness, excitement, หายใจไม่สม่ำเสมอ, มี flexion reflex, มี corneal reflex และม่านตาขยาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องให้เพนโตบาร์บิโทนขนาด 20% ของขนาดที่ให้ครั้งแรก (45 มก./กก.นน.ตัว) เพื่อให้สัตว์ทดลองสลบอยู่ในระดับที่ 3 ซึ่งเป็นระดับความลึกของอาการสลบที่เหมาะในการเตรียมสัตว์ทดลอง

2.2.4.1.3 tracheal canulation หลังจากหนูขาวสลบดีแล้วจึงทำ tracheal canulation เพื่อป้องกันการอุดตันของสิ่งขับแยกในระบบทาง

เดินหายใจในระหว่างที่หนูขาวถูกทำให้สลบ นอกจากนี้ยังใช้บันทึกอัตราการหายใจโดยใช้ thermocouple transducer สอดเข้าใน tracheostomy tube ซึ่งจะบันทึกอัตราการหายใจจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขณะหายใจเข้าและออก

การทำ tracheal canulation นั้นทำโดยจัดให้หนูขาวที่ถูกทำให้สลบแล้วอยู่ในท่านอนหงายยึดขาทั้ง 4 ออกจากกันทั้งขาบนและขาล่างจัดให้ติดแน่นอยู่กับแผ่นกระดานรองรับด้วยเชือก จับคอยึดให้ตรง กรีดผิวหนังบริเวณ midline ยาวพอประมาณไม่เกิน 1.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้ forceps แยกเนื้อเยื่อต่าง ๆ บริเวณคอออกจนถึงหลอดลม ใช้ด้าย 2 เส้นสอดผ่านใต้หลอดลม ณ ตำแหน่งที่ห่างจากด้านล่างของต่อม thyroid ประมาณ 1 เซนติเมตร กรีดหลอดลมให้เป็นช่องขนาดพอเหมาะโดยให้ชิดกับกระดูกอ่อนมากที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงการตัดกล้ามเนื้อหลอดลมซึ่งเป็นเหตุให้มีการเสียเลือดเนื่องจากการตัดผ่านเส้นโลหิตในกล้ามเนื้อ และการมีโลหิตออกเพียงเล็กน้อยอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการอุดตันของทางเดินหายใจได้ สอด polyethylene canula เข้าหลอดลมบริเวณที่ผ่าตรงไปยังปอด แต่ไม่อาจลึกมากเพราะจะเข้าหลอดลมข้างหนึ่งของปอด ผูกด้าย 2 เส้นที่สอดไว้เพื่อยึด canula ให้ติดหลอดลม ในขณะเตรียมสัตว์ทดลองหรือขณะทดลองถ้ามี secretion ให้ดูดด้วย polyethylene canula ขนาดเล็กที่ต่อกับเข็มและกระบอกฉีดยา การสอด polyethylene canula จะต้องระวังไม่สอดเข้าไปลึกกว่า tracheal canula เพราะอาจทำให้เกิดบาดแผลถลอกที่เนื้อเยื่อบุผิวหลอดลมและปอดได้

2.2.4.1.4 jugular vein canulation เพื่อให้เพนโตบาร์บิโทน และอะนาเลปติค

ภายหลังจากทำ tracheal canulation แล้วใช้ปากคีบชนิดทื่อแยกเส้นโลหิตดำ jugular ซึ่งอยู่บริเวณคอใกล้กับหัวไหล่ของหนูขาวออกมาให้ชัดเจน จากนั้นสอดด้าย 2 เส้นเข้าใต้เส้นเลือด ด้ายที่อยู่ด้านหัวหนูใช้ผูกรัดเส้นเลือดให้แน่นเพื่อป้องกันการไหลกลับของโลหิตดำที่มาจากส่วนหัวหนู จากนั้นใช้ปากคีบสอดใต้เส้นเลือด ถ่างปากคีบและยกปากคีบให้สูงเล็กน้อยเพื่อให้เส้นโลหิตดำตึงพอเหมาะ จากนั้นใช้กรรไกรขนาดเล็กขลิบผนังเส้นเลือดดำให้เป็นรูปปากฉลาม สอด canula ที่ตัดปลายเฉลียง

และฝนให้เรียบเข้าไปในเส้นโลหิตดำในทิศทางที่ตรงไปยังหัวใจ โดยประมาณว่าให้ปลาย canula อยู่บริเวณ superior vena cava เมื่อปลายของ canula อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมแล้ว ผูกด้ายที่เหลืออีกเส้นให้แน่นเพื่อยึด canula ให้ติดกับเส้นโลหิต ปลายของ canula อีกข้างต่อกับ three-way luer stopcock และกระบอกฉีดยาซึ่งบรรจุด้วย 0.9% NSS โดยปราศจากฟองอากาศ

2.2.4.1.5 carotid artery canulation เพื่อบันทึกความดันโลหิต การเตรียมทำเช่นเดียวกับข้อ 2.2.4.1.4 แต่ในกรณีของการทำ artery canulation นั้นบรรจุ heparin saline 100 ยูนิตต่อ 1 มล. ใน polyethylene canula, three-way luer stopcock และ syringe เพื่อป้องกันการแข็งตัวของโลหิตซึ่งอาจมีผลต่อการบันทึกความดันโลหิต การสอด canula นั้นควรพยายามสอดให้อยู่ใกล้ aorta ส่วนปลายอีกข้างของ canula ต่อเข้ากับ three-way luer stopcock และ statham pressure transducer ซึ่งสัญญาณไฟฟ้าจาก transducer นี้จะผ่านเข้าสู่ Grass model 7 polygraph ซึ่งจะบันทึกความดันโลหิตทั้ง systolic และ diastolic ลงบนกระดาษบันทึก ภายหลังจากการทำข้อ 2.2.4.1.3, 2.2.4.1.4 และ 2.2.4.1.5 แล้วควรใช้ด้ายที่ผูก canula และเส้นโลหิตทั้ง 2 นั้น เย็บติดกับผิวหนังบริเวณใกล้เคียงกัน เพื่อป้องกันการเลื่อนหลุดของ canula

2.2.4.1.6 electrocorticography (ECoG.) หลังจากเตรียมข้อ 2.2.4.1.5 เรียบร้อยแล้วนำหัวหนูเข้าไปตรึงใน stereotaxic headholder หนังศีรษะถูกตัดตามแนวกลาง (midline) จากระดับตาถึง occipital protuberance หนังศีรษะถูกถลกไปยังด้านข้างขูดเอาพังผืด (fascia) ออกด้วยใบมีดด้านที่ไม่คมเพื่อให้แห้งและเห็น bregma, lumbda ถ้ามีเลือดออกบริเวณ cranial bone ให้หยุดเลือดด้วย bone wax ทำ craniotomy ให้เป็นรูเปิดบริเวณเหนือ bregma ทั้งสองโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มม. โดยใช้ dental drill ทำความสะอาดบริเวณที่ทำ craniotomy ด้วย 0.9% NSS ปกคลุมบริเวณเนื้อสมองด้วย Vaseline ผสมกับ mineral oil บาง ๆ เพื่อไม่ให้เนื้อสมองแห้ง จากนั้นวาง bipolar $Ag/AgCl_2$ electrode ให้สัมผัสกับเนื้อสมองทั้งสองอย่างพอเหมาะ พยายาม

ไม่วาง electrode ให้สัมผัสบริเวณเนื้อสมองที่มีเส้นโลหิตใหญ่ผ่านเพื่อป้องกันการเกิด artifact จาก EKG วาง $Ag/AgCl_2$ electrode อันที่เป็น reference electrode เหนือบริเวณที่ทำ craniotomy ด้านขวาเฉียงไปทางใกล้ mid line ต่อ electrode ทั้งหมดนี้เข้ากับสาย input ต่ออยู่ Grass model 7 polygraph

การบันทึก ECoG. จะต้องวางตัวหนูภายใน shielding cage เพื่อป้องกันสัญญาณไฟฟ้าจากภายนอกเข้ามารบกวน

2.2.4.1.7 electrocardiography (EKG) ผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการเต้นของหัวใจสังเกตโดยการบันทึกคลื่นไฟฟ้าของหัวใจแบบ bipolar limb lead โดยใช้ Subdermal needle electrode ปักบริเวณขาหน้าและขาหลังทั้งสองข้างและนำ electrode ทั้งหมดต่อเข้ากับ Grass model 7 polygraph

2.2.4.1.8 อัตราการหายใจ บันทึกโดยการนำ thermocouple electrode สอดเข้าไปใน tracheal tube และนำ electrode ต่อเข้ากับ Grass model 7 polygraph การเปลี่ยนแปลง resistance เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของ inspired และ exspirated air จะกลายเป็น respiratory signal ซึ่งบันทึกได้โดยเครื่อง polygraph

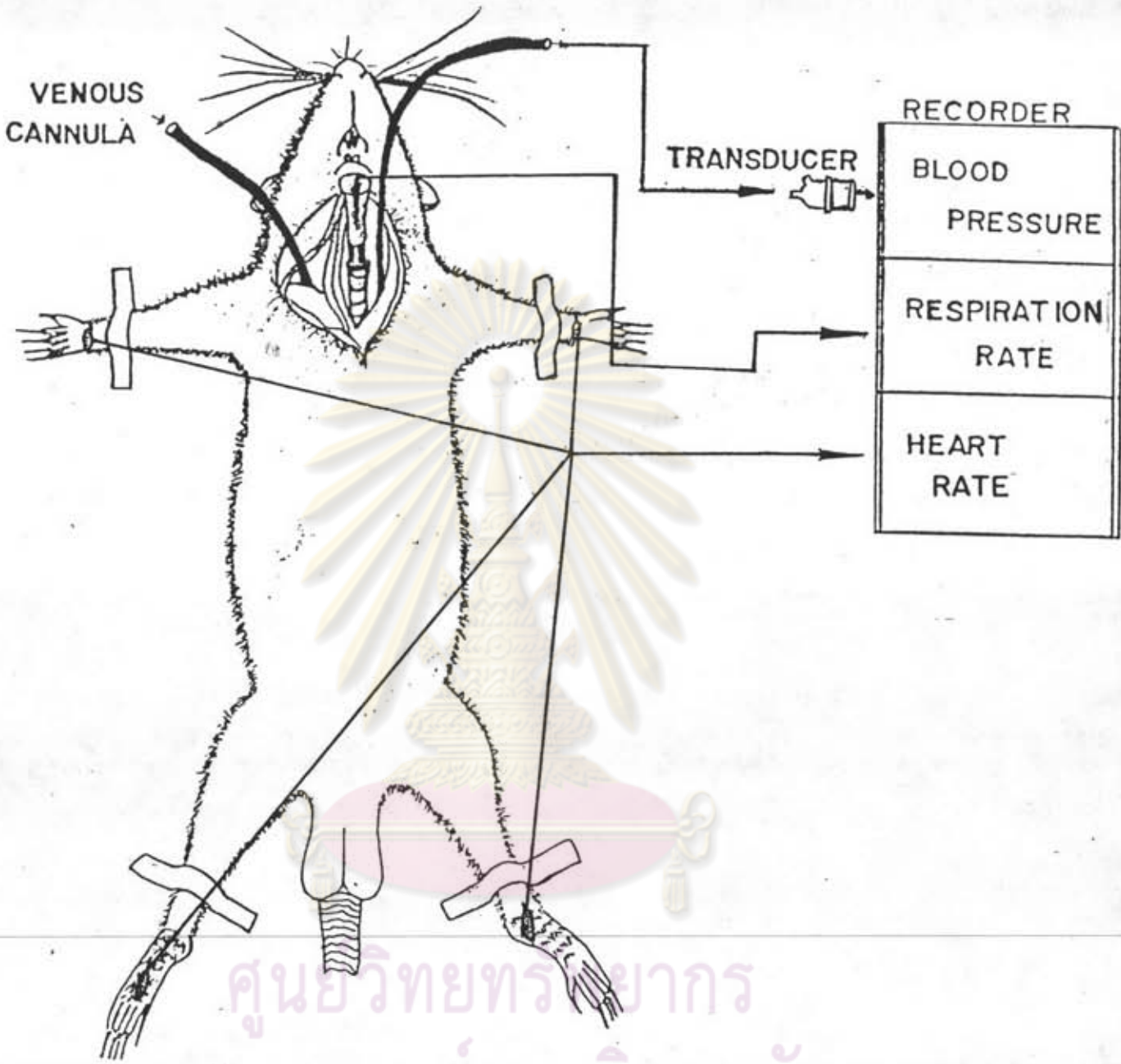
2.2.4.1.9 หลังจากเตรียมหนูขาวเรียบร้อยแล้ว ทำให้หนูขาวเกิดอาการพิษจนกระทั่งหยุดหายใจโดยการฉีดเพนโตบาร์บิโทนเข้าทาง jugular vein ครั้งละ 20% ของขนาดยาที่ทำให้หมดความรู้สึกเมื่อเริ่มแรก (45 มก./กก.นน.ตัว) ทุก 2 นาที จนกระทั่งหนูขาวหยุดหายใจนานประมาณ 15 วินาที จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจ, อัตราการเต้นของหัวใจ, ความดันโลหิต, คลื่นสมองและการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นภายหลังฉีดไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์, เบมีไกรด์ด้วยขนาด 16,32 และ 64 มก./กก.นน.ตัวและพิโครท็อกซินด้วยขนาด 4.4 มก./กก.นน.ตัว เข้าทาง jugular vein โดยทำการบันทึกติดต่อกันเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 1 ชั่วโมง

2.2.4.2 ศึกษาปฏิกิริยาต่อกันระหว่างเพนโตบาร์บิโทนกับไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์ โดยเปรียบเทียบปฏิกิริยาต่อกันกับเบมีไกรด์และพิโครท็อกซินในหนูขาวที่ถูก

ทำให้เกิดอาการพิษด้วยเพนโตบาร์บิโทน จนกระทั่งอยู่ในภาวะ deep narcosis

เตรียมสัตว์ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.4.1.1 - 2.2.4.1.8 แต่ใช้เวลาเตรียมสัตว์ทดลองไม่เกิน 45 นาที จากนั้นทำให้หนูขาวเกิดอาการพิษโดยการฉีดเพนโตบาร์บิโทนเข้าทาง jugular vein ครั้งละ 20% ของขนาดที่ให้ครั้งแรก (45 มก./กก.นน.ตัว) ทุก 2 นาทีจนกระทั่งหนูขาวอยู่ในภาวะ deep narcosis คือไม่มีการตอบสนองต่อ severe pain, หายใจช้า, เบาตื้น แต่ไม่มี cyanosis, mean arterial pressure (MAP) ลดลงจากที่เริ่มต้นบันทึกอย่างน้อย 30% และลักษณะคลื่นสมองมีขนาดและความถี่ต่ำมากจนเกือบเป็นเส้นตรงหรือเป็นเส้นตรง จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจ, อัตราการเต้นของหัวใจ, ความดันโลหิต, คลื่นสมอง และการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นภายหลังฉีดไดออสคอรีน ไฮโดรโบรไมด์, เบมีไกรด์ และพิโครท็อกซินด้วยขนาด 16,16 และ 4.4 มก./กก.นน.ตัว ตามลำดับ เข้าทาง jugular vein ภายหลังหนูขาวได้รับเพนโตบาร์บิโทนครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 2 นาที และบันทึกการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 1 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงการเตรียมหนูขาวโดยการทำ tracheal canulation, carotic artery และ jugular vein canulation, electrocardiography และสอด thermocouple electrode เข้าไปใน tracheostomy tube เพื่อบันทึกอัตราการหายใจ