

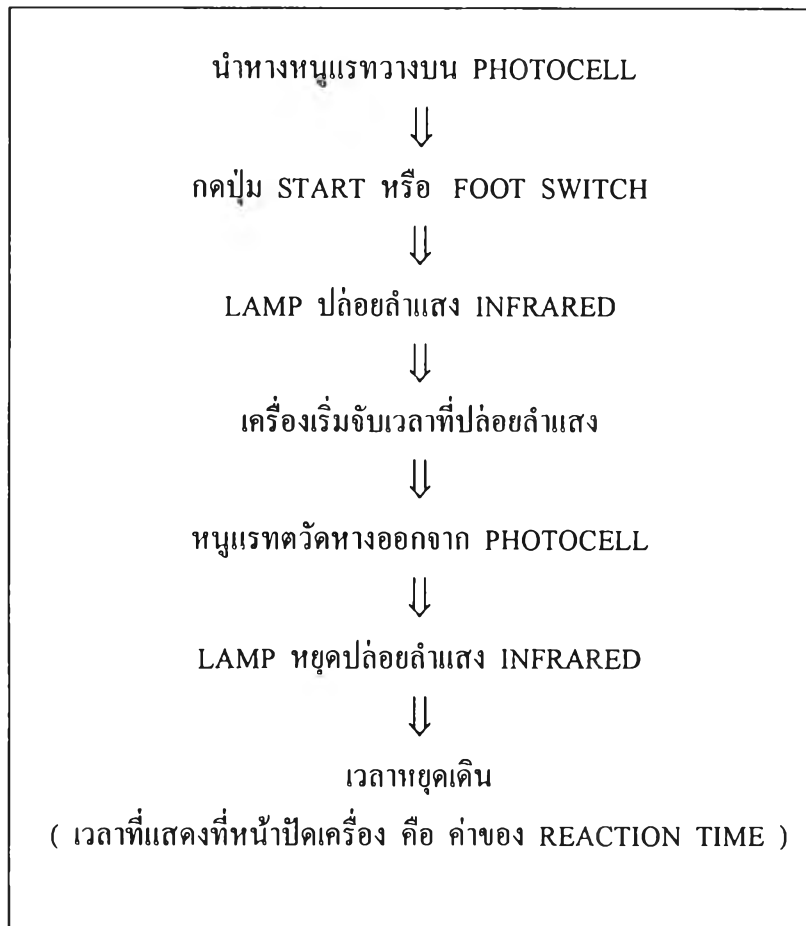
บทที่ 3

วิธีการทดลอง

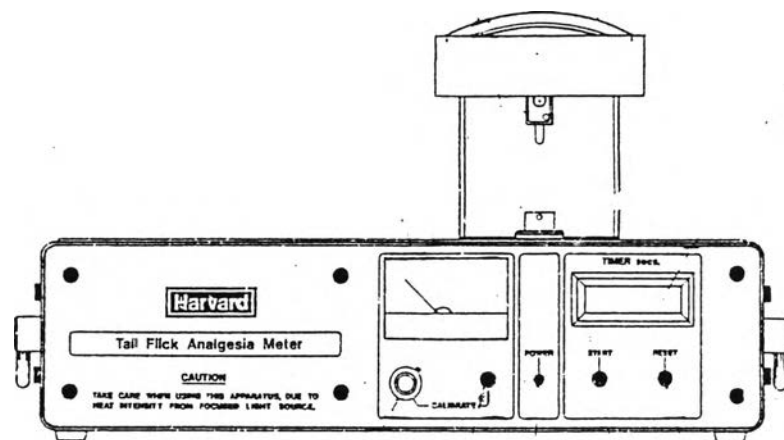
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่อง Harvard Tail Flick Analgesia Meter

เป็นเครื่องมือที่ใช้ทดสอบการตอบสนองการรับรู้สั้กเจ็บปวดในหนูแรท วิธีการวัดค่าเฉลี่ย RT ดูภาคผนวก ก และแสดงขั้นตอนการทำงานของเครื่องดังรูปที่ 6 ค่าที่วัดได้ คือ ค่าเฉลี่ย RT



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการทำงานของเครื่อง Harvard Tail Flick Analgesia Meter



รูปที่ 6 ภาพวาดเครื่อง Harvard Tail Flick Analgesia Meter

3.1.2 เครื่อง Electromyograph Mem 3202 หรือ Neuropack

เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดการนำสัญญาณประสาทของเส้นประสาทที่ทางหนูแรท ค่า parameter ที่วัดได้จากเครื่อง คือ ค่า latency และ ค่า amplitude วิธีการวัดค่าดูภาคผนวก ข

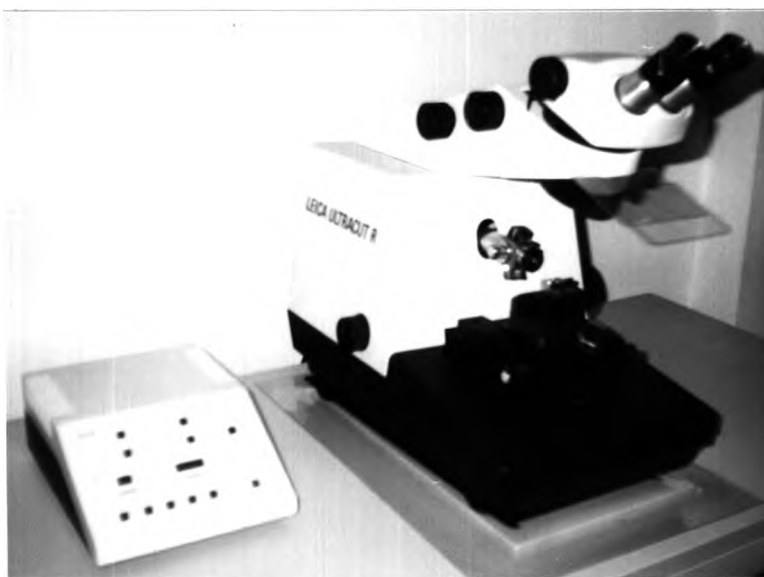


รูปที่ 7 เครื่อง Electromyograph Mem 3202 หรือ Neuropack

3.1.3 เครื่อง Ultramicrotome

เป็นเครื่องมือที่ใช้ตัดชิ้นเนื้อ โดยฝังชิ้นเนื้อลงในพลาสติกซึ่งจะทำให้รายละเอียดต่างๆของเซลล์ และเนื้อเยื่อไม่ถูกทำลายขณะตัดชิ้นเนื้อ

การตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง Ultramicrotome นี้ ใบมีดที่ใช้ต้องเรียบ และคมตลอด ใบมีดไม่มีรอยขรุขระ ถ้ามีดมีรอยขรุขระ จะพบรอยมีดบน section ที่ตัดได้ เครื่องมือนี้สามารถควบคุมความเร็วในการตัด ความหนาของ section ด้วยระบบดิจิทัล ความหนาของ section (thick section และ thin section) ขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของชิ้นเนื้อที่ใช้ในการศึกษา การวิจัยนี้ตัดแบบ thick section หนา 0.5 ไมครอน วิธีการเตรียมชิ้นเนื้อ ดูภาคผนวก ค



รูปที่ 8 เครื่อง Ultramicrotome

3.2 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรท เพศเมียโตเต็มวัย⁵³ น้ำหนักประมาณ 200 – 250 กรัม (น้ำหนักช่วงครั้งแรก ก่อนทำการศึกษา) เลี้ยงหนูแรททรงละ 1 ตัวให้น้ำและอาหารวันละ 1 ครั้ง ในห้องอุณหภูมิ ประมาณ 23 °C ให้แสงสว่าง 12 ชม. สลับมืด 12 ชม. นาน 7 สัปดาห์ แบ่งหนูแรทออกเป็น 3 กลุ่มๆละ 5 ตัว ดังนี้

กลุ่ม C : C – group

เป็นกลุ่มที่ให้ placebo ได้แก่ น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง / สัปดาห์ ขนาด 1 มล. โดยให้เข้าทางช่องท้อง⁵³ หลังจากวัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV เสร็จแล้ว

กลุ่ม P : P – group

เป็นกลุ่มที่ให้ ยาพาคลิแทคเซล 1 ครั้ง / สัปดาห์ ขนาดยา 9 มก. / กก. น้ำหนักตัว⁶ นาน 5 สัปดาห์ โดยให้สารละลายพาคลิแทคเซลในน้ำเกลือที่ปราศเชื้อ เข้าทางช่องท้อง หลังจากวัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV เสร็จแล้ว

กลุ่ม PG : PG – group

เป็นกลุ่มที่ให้ ยาพาคลิแทคเซล ในขนาดเดียวกับที่ให้ในกลุ่ม P ร่วมกับการให้แกงกลิโอไซด์ 6 ครั้ง / สัปดาห์ ขนาดยา 50 มก. / กก. น้ำหนักตัว / วัน⁵⁰ ก่อนหนูแรทได้รับยาพาคลิแทคเซล ครั้งแรกต้องให้แกงกลิโอไซด์ล่วงหน้าติดต่อกัน 3 วัน และหลังจากหนูแรทได้รับยาพาคลิแทคเซล ครั้งสุดท้ายให้แกงกลิโอไซด์ต่ออีก 3 วัน โดยฉีดแกงกลิโอไซด์เข้าทางกล้ามเนื้อสะโพก หลังจากวัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV เสร็จแล้ว

3.3 วิธีทำการทดลอง

3.1 วันแรกของสัปดาห์ที่หนึ่งของการศึกษา วัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV หนูแรททุกกลุ่ม ครั้งที่ 1 (วิธีการวัดค่า ดูภาคผนวก ก , ข)

3.2 วันแรกของสัปดาห์ที่สองของการศึกษา วัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV หนูแรททุกกลุ่ม ครั้งที่ 2 หลังจากวัดเสร็จ ให้ยาตามกลุ่ม ครั้งที่ 1 (ขนาดแรก)

3.3 วันแรกของสัปดาห์ที่สามของการศึกษา วัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV หนูแรททุกกลุ่ม ครั้งที่ 3 หลังจากวัดเสร็จ ให้ยาตามกลุ่ม ครั้งที่ 2

3.4 วันแรกของสัปดาห์ที่สี่ของการศึกษา วัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV หนูแรททุกกลุ่ม ครั้งที่ 4 หลังจากวัดเสร็จ ให้ยาตามกลุ่ม ครั้งที่ 3

3.5 วันแรกของสัปดาห์ที่ห้าของการศึกษา วัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV หนูแรททุกกลุ่ม ครั้งที่ 5 หลังจากวัดเสร็จ ให้ยาตามกลุ่ม ครั้งที่ 4

3.6 วันแรกของสัปดาห์ที่หกของการศึกษา วัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV หนูแรททุกกลุ่ม ครั้งที่ 6 หลังจากวัดเสร็จ ให้ยาตามกลุ่ม ครั้งที่ 5 (ขนาดสุดท้าย)

3.7 วันแรกของสัปดาห์ที่เจ็ดของการศึกษา วัดค่าเฉลี่ย RT , Latency , Amplitude และ NCV หนูแรททุกกลุ่ม ครั้งที่ 7 หลังจากวัดเสร็จ สลบหนูแรทด้วย sodium pentobarbital ขนาดยา 50 มก./กก. น้ำหนักตัว รองหนูแรทสลบ ตัดเส้นประสาท sciatic ทั้งสองข้างของหนูแรท ทุกตัว แบ่งเส้นประสาทแต่ละเส้น ออกเป็น 2 ส่วน

3.8 นำเส้นประสาท sciatic ส่วนที่ 1 มาฝังชิ้นเนื้อในพลาสติก และตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง Ultramicrotome (วิธีการเตรียมชิ้นเนื้อ ดูภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลง ลักษณะทางกายวิภาคและพยาธิวิทยาของเส้นประสาท ตัดชิ้นเนื้อแบบ cross section หนา 0.5 ไมครอน ศึกษาชิ้นเนื้อที่ตัดได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

3.9 ฉีกเส้นประสาท sciatic ส่วนที่ 2 (วิธีการเตรียมชิ้นเนื้อ ดูภาคผนวก ง) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคและพยาธิวิทยาของเส้นประสาทที่ละไฟเบอร์

3.4 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

การวัดค่า RT ของหนูแรทแต่ละตัวในแต่ละสัปดาห์ โดยวัดค่า RT จำนวน 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย บันทึกค่าเฉลี่ยลงในตารางบันทึกผลการทดลอง บันทึกผลจนครบ 7 ครั้ง (1 ครั้งเท่ากับ 1 สัปดาห์)

การวัดค่า Latency , Amplitude และ NCV ของหนูแรทแต่ละตัวในแต่ละสัปดาห์ โดยวัดค่า Latency จำนวน 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย วัดค่า Amplitude จำนวน 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย และวัดค่า NCV จำนวน 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย บันทึกค่าเฉลี่ย Latency , Amplitude และ NCV ลงในตารางบันทึกผลการทดลอง บันทึกผลจนครบ 7 ครั้ง (1 ครั้งเท่ากับ 1 สัปดาห์)

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาค และพยาธิวิทยาของเส้นประสาท sciatic โดยศึกษาจากสไลด์เส้นประสาท sciatic ที่ถูกตัดตามขวางหนา 0.5 ไมครอน โดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา สังเกตสิ่งต่อไปนี้ จำนวน fascicles การเปลี่ยนแปลงของเส้นใยประสาท ความหนาแน่นของเส้นใยประสาท และการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มพันของเส้นใยประสาท ได้แก่ epineurium , perineurium , endoneurium รวมทั้งหลอดเลือดที่อยู่รอบๆ

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาค และพยาธิวิทยาของเส้นประสาท sciatic โดยศึกษาจากสไลด์เส้นประสาท sciatic ที่ถูกฉีก การฉีกเส้นประสาทเป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาค และพยาธิวิทยาของเส้นประสาทที่มีมัยอิติ ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อแยกประเภทของเส้นใยประสาท บันทึกผลการแยกประเภทของเส้นใยประสาทลงในตารางบันทึกผลการทดลอง การประเมินต้องดูอย่างน้อย 100 ไฟเบอร์

3.5 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 การวิเคราะห์ข้อมูล การวัดค่า RT , Latency , Amplitude และ NCV

ข้อมูลการวิจัยที่ได้ เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ (quantitative) โดยใช้ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) นำเสนอข้อมูลด้วย ตารางและฮิสโตแกรม สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐาน คือ Nonparametric test (Kruskal Wallis One Way Analysis of Variance by Rank) โดยเปรียบเทียบผลการทดลอง ทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม C กับกลุ่ม P , กลุ่ม C กับกลุ่ม PG และกลุ่ม P กับกลุ่ม PG

3.5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาค และพยาธิวิทยาของเส้นประสาท sciatic ที่ถูกตัดตามขวางและจากการฉีกเส้นประสาท

ข้อมูลการวิจัยที่ได้ เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ (qualitative) นำเสนอข้อมูลด้วยรูปภาพ สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐาน คือ Descriptive เปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม C กับกลุ่ม P , กลุ่ม C กับกลุ่ม PG และกลุ่ม P กับกลุ่ม PG