

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพัฒนา โดยการพัฒนาองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพเพื่อประโยชน์ในการรักษาและการบริการด้านสุขอนามัยในสัตว์เลี้ยง ซึ่งเป็นการศึกษาผลของการใช้ยาที่พอกชาลินซึ่งเป็นยาด้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ในการจัดการความปวดภายหลังการศัลยกรรมทำหมันเพศเมียในกระต่ายที่เลี้ยงไว้ในห้องพักสัตว์ อาคารสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1 สัตว์ทดลอง

กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White; *Oryctolagus cuniculi*) เพศเมีย อายุ 6-12 (10.07 ± 0.33) เดือน น้ำหนัก 2.6-3.6 (2.91 ± 0.06) กิโลกรัม ที่มีร่างกายสมบูรณ์แข็งแรงโดยประเมินจากการตรวจทางกายภาพ (physical examination) อย่างละเอียด จำนวน 21 ตัว จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และนำมาเลี้ยงในห้องพักสัตว์ อาคารสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยปรับให้กระต่ายทุกตัวอยู่ในสภาพแวดล้อมและการจัดการเดียวกันอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ก่อนทำการทดลอง ดังภาพ 8 และ 9 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- 1) กรงที่ใช้เลี้ยงกระต่าย เป็นกรงเหล็กเคลือบสีกันสนิม ขนาด $60 \times 44 \times 42$ เซนติเมตร ซึ่งปูรองด้วยกระดาษที่ถาดรองรับสิ่งปฏิกูลได้กรง ใช้เลี้ยงกระต่าย 1 ตัวต่อกรง
- 2) ความสว่างภายในห้อง ควบคุมให้มีแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ในช่วง 7.00-19.00 น.
- 3) อุณหภูมิภายในห้อง ควบคุมให้อยู่ระหว่าง 25-27 องศาเซลเซียส ตลอด 24 ชั่วโมง
- 4) อาหารและน้ำที่ใช้เลี้ยงกระต่าย จัดให้แบบไม่จำกัด (ad libitum) โดยเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูปใส่ไว้ในถาดอาหารและน้ำสะอาดใส่ไว้ในขวดบรรจุที่แขวนไว้ด้านข้างกรง
- 5) ฝึกความเคยชินให้กับกระต่าย ทั้งต่อการปฏิบัติงานของผู้วิจัย เจ้าหน้าที่เลี้ยงสัตว์และกล้องวิดีโอที่ใช้ในการบันทึกพฤติกรรม

การจัดการด้านการเลี้ยงสัตว์ทดลองทั้งหมดนี้ผ่านการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการสัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



ภาพ 8 กระต่ายถูกเลี้ยงในกรงเหล็กเคลือบสีกันสนิม กรงละ 1 ตัว โดยจัดให้มีอาหารและน้ำให้
กระต่ายกินแบบไม่จำกัด



ภาพ 9 ลักษณะถาดรองรับสิ่งปฏิกูลใต้กรงที่ถูกปูรองด้วยกระดาษเพื่อใช้เก็บตัวอย่างอุจจาระ

3.2 การแบ่งกลุ่มทดลอง

ทำการศึกษาทดลองโดยการสุ่มแบ่งกระต่ายออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว ได้แก่ กลุ่มยาหลอก (placebo) กลุ่มยาทีพอกซาลิน I (tepoxalin-treated group I) และ กลุ่มยาทีพอกซาลิน II (tepoxalin-treated group II) โดยมีรายละเอียดของแต่ละกลุ่ม ดังตาราง 1

ตาราง 1 ขนาดยาหลอกหรือยาทีพอกซาลินที่ให้กระต่ายแต่ละกลุ่มในรูปแบบกิน แบ่งตามขนาดยาเริ่มต้นและขนาดยาภายหลังการศัลยกรรม 24 ชั่วโมง

กลุ่ม	ขนาดยาเริ่มต้น	ขนาดยาภายหลังการศัลยกรรม 24 ชั่วโมง
ยาหลอก	น้ำเปล่า 0.1 มล./กก.	น้ำเปล่า 0.1 มล./กก.
ยาทีพอกซาลิน I	ยาทีพอกซาลิน 10 มก./กก.	ยาทีพอกซาลิน 10 มก./กก.
ยาทีพอกซาลิน II	ยาทีพอกซาลิน 20 มก./กก.	ยาทีพอกซาลิน 10 มก./กก.

การให้ยาทีพอกซาลิน (Zubrin[®], Shering-Plough Co. Ltd., Harefield, United Kingdom) ทำโดยการบดยาละลายน้ำในอัตราส่วนของยาทีพอกซาลิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร ดังภาพ 8 ซึ่งการให้ยาหลอกหรือยาทีพอกซาลินในรูปแบบกิน ทำโดยป้อนให้กระต่ายก่อนการศัลยกรรม 2 ชั่วโมง และทุก 12 ชั่วโมง ภายหลังการศัลยกรรม เป็นเวลา 3 วัน

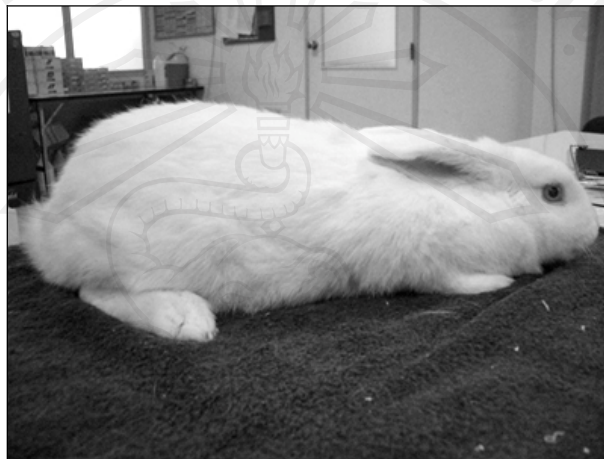


ภาพ 10 ลักษณะยาทีพอกซาลินก่อนบดและหลังจากถูกบดละลายในน้ำ

3.3 การศัลยกรรมทำหมันเพศเมียในกระต่าย

การเตรียมตัวสัตว์ก่อนการศัลยกรรม

- 1) ทำการงดน้ำและอาหารกระต่ายก่อนการวางยาสลบเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 2) ทำการตรวจร่างกายกระต่ายอย่างละเอียด โดยกระต่ายที่ทำศัลยกรรมต้องมีสุขภาพร่างกายปกติโดยประเมินจากการตรวจทางกายภาพก่อนการศัลยกรรม ดังภาพ 11



ภาพ 11 กระต่ายที่มีสุขภาพร่างกายปกติจากการตรวจทางกายภาพอย่างละเอียดก่อนการศัลยกรรม

- 3) ทำการเหนี่ยวนำการสลบด้วยยาเคตามีน ไฮโดรคลอไรด์ (ketamine hydrochloride; Ketamil[®], Troy Laboratories Pty. Ltd., New South Wales, Australia) ขนาด 35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร่วมกับ ยาไซลาซีน ไฮโดรคลอไรด์ (xylazine hydrochloride; Xylaz[®], RVET, Bladel, Holland) ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และยาเอซโพรมาซีน (acepromazine; Combistress[®], Anitech Total Solution Co., Ltd., Bangkok, Thailand) ขนาด 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

- 4) ทำการให้สารน้ำ (0.9% saline solution) ผ่านเส้นเลือดดำที่บริเวณใบหู (marginal ear veins) ด้วย intravenous catheter ขนาด 24 gauge ดังภาพ 12



ภาพ 12 เส้นเลือดดำที่บริเวณใบหู ที่ถูกเปิดด้วย intravenous catheter ขนาด 24 gauge

5) ทำการฉีดยาปฏิชีวนะโดยให้ยาเอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin; Baytril[®], Bayer AG, Leverkusen, Germany) ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าชั้นใต้ผิวหนัง ดังภาพ 11 และให้ยาภายหลังการศัลยกรรม ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน เพื่อควบคุมและป้องกันการติดเชื้อภายหลังการศัลยกรรม



ภาพ 13 การฉีดยาเอนโรฟลอกซาซินขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าชั้นใต้ผิวหนังกระต่าย

6) ทำการฉีดยา ترامาดอล (tramadol; Tramazac[®], Pharmaland (1982) Co. Ltd., Bangkok, Thailand) ขนาด 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าเส้นเลือดดำ เพื่อควบคุมและระงับปวดขณะศัลยกรรม โดยยาชนิดนี้จะหมดฤทธิ์ไปภายใน 4-6 ชั่วโมง โดยไม่มีผลรบกวนการประเมินความปวดภายหลังการศัลยกรรม

7) จัดให้กระต่ายอยู่ในท่านอนหงาย (dorsal recumbency) และทำการโกนขนที่บริเวณหน้าท้องซึ่งต้องทำด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากผิวหนังกระต่ายมีลักษณะบางและอาจฉีกขาดง่าย ดังภาพ 14



ภาพ 14 กระต่ายในท่านอนหงาย และโกนขนที่บริเวณหน้าท้อง

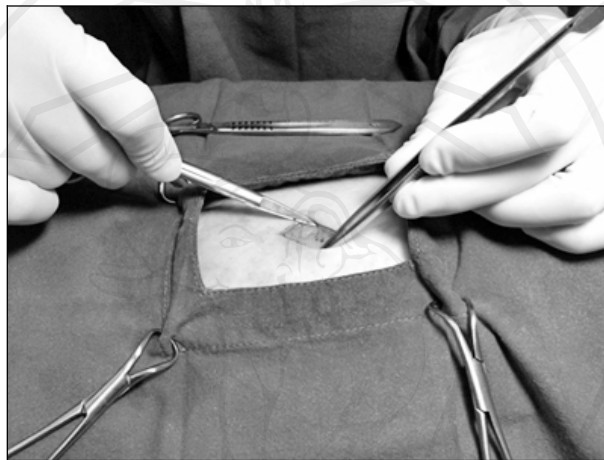
8) ทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการผ่าตัดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อคลอเฮกซิดีน (chlorhexidine, Pharmaland (1982) Co. Ltd., Bangkok, Thailand) และฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 (alcohol, Liquor Distillery Organization Excise Department, Bangkok, Thailand) โดยขั้นตอนทั้งหมดทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

9) ทำการเติมยาเคตามีนขนาด 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าเส้นเลือดดำก่อนกรีดผ่า โดยตรวจภาวะการสลบที่สามารถสลบได้จากการปราศจากการตอบสนองของ righting reflex, ear-pinch reflex และ toe-pinch reflex ร่วมกับการไม่มี jaw muscle tone

การศัลยกรรม

กระต่ายทุกตัวจะได้รับการศัลยกรรมโดยสัตยสัตวแพทย์เพียงคนเดียว ทั้งนี้ เพื่อควบคุมความแปรปรวนของความปวดและการบาดเจ็บจากการศัลยกรรมซึ่งแปรผันตามสัตยสัตวแพทย์ โดยวิธีการศัลยกรรมทำหมันเพศเมีย (Flecknell, 2000) มีดังนี้

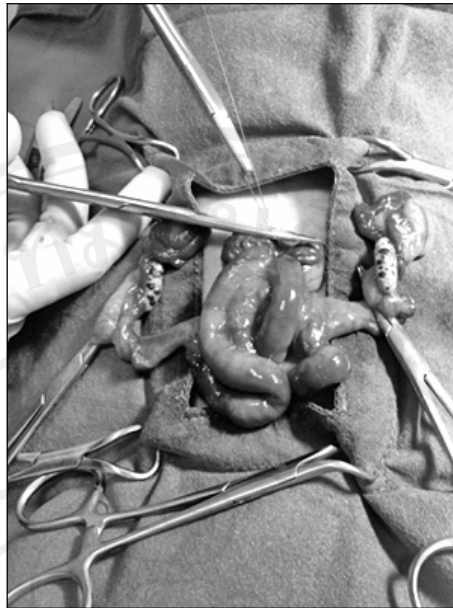
- 1) กรีดเปิดชั้นผิวหนังของช่องท้องที่บริเวณเส้นกลางลำตัว (ventral midline) ที่ตำแหน่งระหว่างสะดือและเชิงกราน ความยาว 2.5-3 เซนติเมตร ดังภาพ 15



ภาพ 15 การกรีดเปิดชั้นผิวหนังของช่องท้องที่บริเวณเส้นกลางลำตัว ที่ตำแหน่งระหว่างสะดือและเชิงกราน

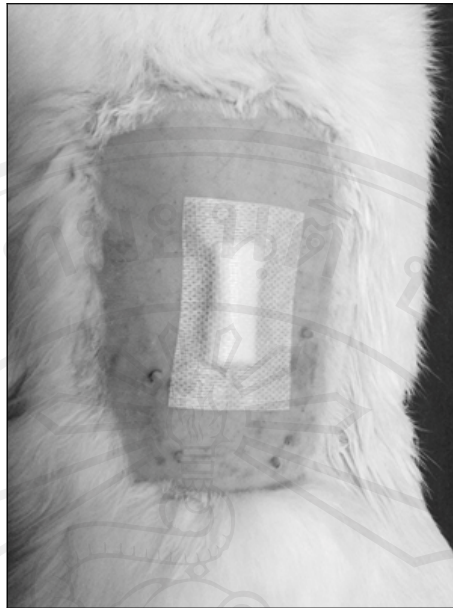
- 2) ใช้ปากคีบยกกล้ามเนื้อช่องท้องขึ้นก่อนกรีดเปิดชั้นกล้ามเนื้อ เพื่อป้องกันมีดกรีดทำลายอวัยวะภายในต่างๆในช่องท้อง

- 3) ขกมดลูกซึ่งมีสีชมพูเมื่อเปรียบเทียบกับทางเดินอาหารซึ่งมีสีเข้มกว่า รวมทั้งรังไข่ขึ้นมามัดแยก โดยมัดที่บริเวณเหนือรังไข่ทั้ง 2 ข้างและเหนือคอมดลูกโดยใช้ไหมละลาย (polyglactin 910 suture material; 'Vicryl', Ethicon Inc., Edinburgh, Scotland) ขนาด 3/0 ดังภาพ 16



ภาพ 16 แสดงมดลูกที่ถูกยกขึ้นมามัดแยกบริเวณเหนือคอมดลูก และรังไข่ที่ถูกตัดหลังมดแยกที่บริเวณเหนือรังไข่ทั้ง 2 ข้าง

- 4) ทำการตัดยกมดลูกและรังไข่ออก
- 5) เย็บปิดกล้ามเนื้อช่องท้องด้วยไหมละลายชนิดเดียวกับข้อ 3) ด้วยวิธี simple interrupted pattern
- 6) เย็บชั้นใต้ผิวหนังด้วยไหมละลายชนิดเดียวกับข้อ 3) ด้วยวิธี simple continuous pattern
- 7) เย็บปิดชั้นผิวหนังด้วยไหมไนลอนที่ไม่ละลาย (nylon monofilament; 'Nylon', Frago Impex Sdn. Bhd., Kuala Lumpur, Malaysia) ขนาด 3/0 ด้วยวิธี simple interrupted pattern
- 8) แตะบริเวณแผลด้วยยาโพวิโดน ไอโอดีน ความเข้มข้นร้อยละ 10 (povidone iodine, LFD Manufacturing Ltd., Pathumthani, Thailand) และปิดด้วยเทปปิดแผล ดังภาพ 17



ภาพ 17 การปิดแผลผ่าตัดด้วยเทปปิดแผล ภายหลังแฉะแผลด้วยยาโพวิโดน ไอโอดีน

โดยระยะเวลาทั้งหมดในการสลบ ตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมตัวสัตว์ก่อนการศัลยกรรมจนถึงเสร็จสิ้นการศัลยกรรมใช้เวลาประมาณ 50-60 นาที และระยะเวลาในการศัลยกรรมประมาณ 25-30 นาที

การปฏิบัติต่อสัตว์ภายหลังการศัลยกรรม

1) ฉีดยาด้านฤทธิ์ไซลาซีนด้วยยาโยฮิมบิน (yohimbine; Reverzine[®], Pamell Laboratories Pty. Ltd., New South Wales, Australia) ขนาด 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าเส้นเลือดดำ เพื่อด้านฤทธิ์ยาสลบภายหลังเสร็จสิ้นการศัลยกรรมและทำให้กระต่ายรู้สึกตัวทันที

2) นำกระต่ายเข้ากรงเดิมเพื่อพักผ่อน จากนั้นเมื่อกระต่ายรู้สึกตัวเต็มที่จนกลับเข้าสู่ภาวะปกติจึงทำการยุติการให้สารน้ำ และทำการให้อาหารและน้ำตามปกติ

3) ภายหลังการศัลยกรรมทุก 12 ชั่วโมง ทำการเก็บข้อมูลและประเมินภาวะความปวดต่อไป

4) การปฏิบัติต่อสัตว์นอกช่วงเวลาเก็บข้อมูล ตั้งแต่วันที่ 4-7 ภายหลังการศัลยกรรม ได้ทำการฉีดยาเอนโรฟลอกซาซินขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทุก 24 ชั่วโมง เข้าชั้นใต้ผิวหนัง เพื่อป้องกันการติดเชื้อหลังการผ่าตัด และทำการฉีดยาคาร์โปรเฟน (carprofen; Rimadyl[®], Vericore

Ltd., Dundee, Scotland) ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทุก 24 ชั่วโมง เข้าชั้นใต้ผิวหนัง เพื่อระงับความปวดจากการศัลยกรรม จนกระทั่งทำการตัดไหมในวันที่ 7 ภายหลังการศัลยกรรม

3.4 การเก็บข้อมูล

การเก็บข้อมูลด้านปริมาณอาหารและน้ำ

ทำการเก็บรวบรวมและบันทึกข้อมูลปริมาณการกินอาหารและน้ำทั้งก่อนและหลังการศัลยกรรมน้ำเป็นประจำวัน โดยแสดงผลเป็นของปริมาณการกินอาหารและน้ำทุก 24 ชั่วโมง ออกมาเป็นร้อยละ (percentage) ซึ่งปริมาณอาหารและน้ำที่กระต่ายกินใน 24 ชั่วโมง ก่อนการศัลยกรรม คิดเป็นร้อยละ 100 และเปรียบเทียบกับปริมาณอาหารและน้ำที่กระต่ายกินใน 24 ชั่วโมง ภายหลังการศัลยกรรม

การประเมินภาวะความปวด

การประเมินภาวะความปวดพิจารณาจากการตอบสนองต่อความปวดทางพฤติกรรมโดยการให้คะแนนความปวดจากมาตราส่วนประมาณค่าแบบตัวเลข และการตอบสนองต่อความปวดทางสรีรวิทยาโดย การตรวจวัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในอุจจาระ ซึ่งทำการเก็บข้อมูลก่อนและหลังการศัลยกรรมในกระต่ายแต่ละตัว

1. การประเมินความปวดจากการตอบสนองด้านพฤติกรรม

การประเมินการตอบสนองต่อความปวดทางพฤติกรรมทำการสังเกตจากเทปวิดีโอที่บันทึกไว้จากกล้องที่ติดตั้งไว้หน้ากรงเลี้ยง ซึ่งบันทึกที่เวลา 12 และ 0 ชั่วโมง ก่อนศัลยกรรม และ 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง หลังศัลยกรรม ครั้งละ 20 นาที การประเมินทำการให้คะแนนความปวดจากมาตราส่วนประมาณค่าแบบตัวเลข ที่แบ่งเป็น 11 ระดับ โดยใช้ตัวเลข 0 ถึง 10 แทนระดับ ความรุนแรงของความปวด ตามเกณฑ์ดังตาราง 2 ซึ่งดัดแปลงมาจาก Guidelines for Preventing, Recognizing, and Treating Pain in the Hospital Setting Guidelines for Pet Owners for Recognizing Pain in their Dogs and Cats Husbandry and Standards of Care for Pet Owners โดย Hunton และคณะ (2007) และ An ethogram of rabbit behavior โดย Leach และคณะ (2009)

ตาราง 2 เกณฑ์สำหรับประเมินการตอบสนองต่อความปวดทางพฤติกรรม โดยการให้คะแนนความปวดจากมาตราส่วนประมาณค่าแบบตัวเลข

การเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรม							ระดับความปวด
ร่าริง	ดูแดง	นอน	หลับ	ขยับตัว	โก่งตัว	เกร็งท้อง	
++	++	++	+	++	-	-	0 ไม่มีความปวด (No pain)
++	+	++	+	++	-	-	1 น่าจะไม่มี ความปวด (Probably no pain)
+	+	+	+	+	-	-	2 ไม่สะดวกสบายเล็กน้อย (Mild discomfort)
+	+	+	+	+	+	-	3 ปวดเล็กน้อย (Mild pain)
+	-	+	-	+	+	+	4 ปวดเล็กน้อยถึงปานกลาง (Mild to moderate pain)
-	-	+	-	+	+	+	5 ปวดปานกลาง (Moderate pain)
-	-	+	-	+	+	+	6 ปวดปานกลางถึงเพิ่มขึ้น (Increased moderate pain)
-	-	++	-	+	++	+	7 ปวดปานกลางถึงรุนแรง (Moderate to severe pain)
-	-	++	-	-	++	+	8 ปวดรุนแรง (Severe pain)
-	-	++	-	+	++	+	9 ปวดรุนแรงถึงทรมาน (Severe to excruciating pain)
-	-	++	-	+	++	++	10 อยู่ในภาวะเกือบไม่รู้สึกรู้ส (Almost comatose)

++ หมายถึง แสดงพฤติกรรมนั้นมาก, + หมายถึง แสดงพฤติกรรมนั้น และ - หมายถึง ไม่แสดงพฤติกรรมนั้น

คัดแปลมาจาก Guidelines for Preventing, Recognizing, and Treating Pain in the Hospital Setting Guidelines for Pet Owners for Recognizing Pain in their Dogs and Cats Husbandry and Standards of Care for Pet Owners โดย Hunton และคณะ (2007) และ An ethogram of rabbit behavior โดย Leach และคณะ (2009)

การประเมินความปวดโดยการให้คะแนนความปวดจากมาตราส่วนประมาณค่าแบบตัวเลข ในการศึกษาี้ อาศัยผู้ประเมินทั้งหมด 4 คน ประกอบด้วย สัตวแพทย์ผู้มีความชำนาญด้านการดูแล และรักษาสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก จำนวน 3 คน และเจ้าหน้าที่เลี้ยงสัตว์ จำนวน 1 คน โดยทำการประเมินแบบใช้วิธีปราศจากอคติ กล่าวคือผู้ประเมินทั้ง 4 ไม่ทราบข้อมูลการให้ยาของกระต่าย แต่ละตัว รวมทั้งการประเมินเป็นไปโดยมีอิสระต่อกันและไม่มีการซักถามกัน จากนั้นรวบรวม ข้อมูลที่ได้แต่ละครั้งและแต่ละกลุ่มมาหาค่าเฉลี่ยต่อไป

ในกรณีที่สังเกตพบว่ากระต่ายแสดงพฤติกรรมปวดที่ระดับความรุนแรงของความปวด มากกว่า 5 ผู้วิจัยต้องยุติการทดลองและทำการฉีดยาลดปวดเข้าแทรก (intervention analgesia) ทันที โดยการให้ยาคาร์โปรเฟน ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนังเพื่อระงับความปวด จากการศัลยกรรม

2. การประเมินความปวดจากการตอบสนองด้านสรีรวิทยา

การตรวจการตอบสนองต่อความปวดทางสรีรวิทยาแบบไม่คุกคามตัวสัตว์ ทำโดยตรวจวัด ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในอุจจาระ ซึ่งแบ่งเป็นหัวข้อย่อย ดังนี้

2.1 การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระบนกระดาษรองที่อยู่ในถาดรองรับสิ่งปฏิกูลใต้กรงเลี้ยงกระต่าย แต่ละตัว ที่ 12 และ 0 ชั่วโมง ก่อนศัลยกรรม และ 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง หลังศัลยกรรม ภายหลังการบันทึกพฤติกรรมปวด โดยทำการเปลี่ยนกระดาษรองใหม่ทุกครั้งก่อนการเก็บตัวอย่าง 1 ชั่วโมง ซึ่งอุจจาระที่เก็บจะไม่มีการปนเปื้อนกับปัสสาวะของกระต่าย ทั้งนี้ ตัวอย่างอุจจาระที่เก็บ ได้ในแต่ละวันถูกเก็บไว้ในถุงพลาสติกปิดสนิทแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมา สกัดฮอร์โมนต่อไป

2.2 การสกัดฮอร์โมนคอร์ติซอลจากอุจจาระ

วิธีการสกัดฮอร์โมนคอร์ติซอลจากอุจจาระได้ปฏิบัติตามขั้นตอนที่อธิบายไว้โดย Brown และคณะ (1994) ดังนี้

- 1) นำอุจจาระที่ถูกแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่ อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปอบในตู้อบความร้อนด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุจจาระ แห้งสนิท โดยใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

- 2) บดตัวอย่างอุจจาระให้เป็นผงละเอียดและคลุกเคล้าให้เข้ากัน ก่อนจะนำไปชั่งโดยใส่ใน หลอดทดลองขนาด 16×125 มิลลิเมตร นำหนักตัวอย่างละ 0.1 กรัม

3) นำตัวอย่างที่ซั้งแล้วมาละลายในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 (90% ETOH) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และเขย่าเล็กน้อยด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง (vortex) เพื่อให้เข้ากัน

4) นำตัวอย่างที่ได้ไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยไม่ให้กันหลอดทดลองสัมผัสกับพื้นอ่างเพื่อป้องกันการปะทุของสารภายในหลอด

5) เติมนเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 ลงไปให้ใกล้เคียงระดับสารเริ่มต้นตลอดระยะเวลาที่ต้ม ดังภาพ 18

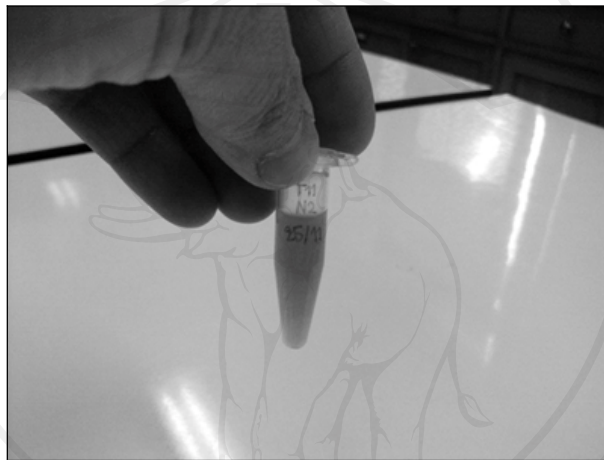


ภาพ 18 การเติมนเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 ลงไปให้ใกล้เคียงระดับสารเริ่มต้น ตลอดระยะเวลาที่ต้ม

- 6) นำตัวอย่างที่ต้มแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
- 7) รินสารสกัดที่ได้ลงในหลอดทดลองอันที่สองที่มีขนาดเท่ากัน และแยกเก็บไว้ก่อน
- 8) เติมนเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองอันแรก และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลองให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 วินาที
- 9) นำตัวอย่างในหลอดทดลองอันแรกไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
- 10) รินสารสกัดที่ได้ลงในหลอดทดลองอันที่สองซึ่งมีสารสกัดจากรอบแรกอยู่แล้ว

11) นำหลอดทดลองอันที่สองไปทำให้แห้งน้ำโดยต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิและใช้ลมเป่าไล่ก๊าซที่ระเหยขึ้นมาให้ออกไปอย่างรวดเร็ว ให้เหลือสารสกัดเข้มข้นที่ก้นหลอดทดลองเพียงเล็กน้อย

12) ทำการเติม dilution buffer (0.01 M PO_4 , 0.14 M NaCL, 0.5% BSA, pH 7.4) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในสารสกัดเข้มข้น เขย่าเล็กน้อยและรินเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube) ดังภาพ 19 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในอุจจาระต่อไป



ภาพ 19 สารสกัดเข้มข้นที่ถูกเติม dilution buffer ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอล

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในงานวิจัยนี้ทำโดยอาศัยวิธีการ enzyme immunoassay (EIA) ซึ่งได้ปฏิบัติตามขั้นตอนที่อธิบายไว้โดย Young และคณะ (2004) ดังนี้

วันที่ 1:

3.1 การเคลือบแอนติบอดีต่อฮอร์โมนคอร์ติซอลในอีไลซาเพลท (ELISA plate)

เตรียม working dilution ที่อัตราส่วน 1:8500 โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อคอร์ติซอล (R4866; C. Munro, University of California-Davis, 1:85, -20 องศาเซลเซียส) 50 ไมโครลิตร ผสม

กับ coating buffer 5 มิลลิลิตร หยดลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร ยกเว้นในแถว A1 แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 12 ชั่วโมง วันที่ 2:

3.2 การเตรียมสารมาตรฐาน (standard; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

เตรียมสารมาตรฐานที่มีปริมาณ 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 และ 3.9 พิโกกรัมต่อหลุม โดยการทำให้เจือจางแบบ 2 fold serial dilution จาก standard working stock 250 ไมโครลิตร ผสมกับ EIA buffer 250 ไมโครลิตร

3.3 การเตรียมตัวควบคุม (control) และตัวอย่าง

เตรียมตัวควบคุม (C1, C2) โดยให้ C1 เป็นตัวควบคุมที่มีอัตราการจับของสารติดสี (labeled antigen) กับแอนติบอดี ร้อยละ 30 (high control) และให้ C2 เป็นตัวควบคุมที่มีอัตราการจับของสารติดสี (labeled antigen) กับแอนติบอดี ร้อยละ 70 (low control) พร้อมทั้งนำตัวอย่างออกมาจากตู้แช่แข็ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลองให้สารสกัดเข้ากัน ทั้งหมดก่อนนำมาใช้โดยไม่ต้องทำการเจือจางตัวอย่าง

3.4 การเตรียม HRP (cortisol-horseradish peroxidase-conjugated label)

เตรียม HRP working dilution ที่อัตราส่วน 1:20,000 จาก HRP 25 ไมโครลิตร ผสมกับ EIA buffer 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นจนกระทั่งถึงเวลานำมาหยดลงในเพลท

3.5 การล้างเพลท

นำเพลทที่เคลือบแอนติบอดีต่อฮอร์โมนคอร์ติซอลที่พร้อมใช้แล้ว มาทำการล้างด้วย wash solution 5 ครั้ง และกำจัด wash solution ส่วนเกินจากการทำปฏิกิริยาออกด้วยการเคาะเพลทกับผ้าที่สะอาด

3.6 การหยอดหลุม (plate loading)

หยดสารมาตรฐาน ตัวควบคุมและตัวอย่าง ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในเพลทตามแผนที่เพลท (plate map) แบบทำซ้ำกัน 2 หลุม (duplicate) อย่างรวดเร็วและแม่นยำ จากนั้นหยด HRP ที่เตรียมไว้แล้ว 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทุกหลุมโดยไม่ให้เกิดการกระเด็นเปื้อนด้านข้างหลุม ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องทำให้เร็วที่สุดภายใน 10 นาที จากนั้นปิดปากหลุมด้วย acetate plate sealer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง

3.7 การล้างเพลทซ้ำ

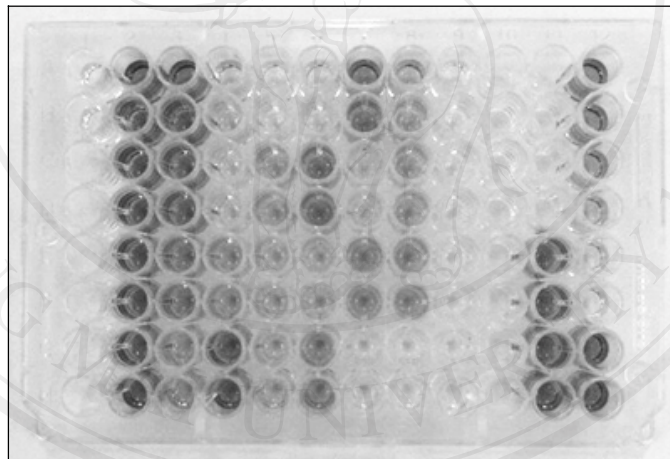
นำเพลทที่ผ่านการหยอดหลุมแล้ว มาทำการล้างด้วย wash solution 5 ครั้ง และกำจัด wash solution ส่วนเกินจากการทำปฏิกิริยาออกด้วยการเคาะเพลทกับผ้าที่สะอาด แต่ขั้นตอนนี้ต้องควบคุมเวลาไม่ให้เกิน 20 นาที

3.8 การเติมซับสเตรท (substrate)

เตรียม ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) ซับสเตรทในขั้นตอนการล้างเพลทซ้ำ โดยผสม 0.5 M H_2O_2 ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ 40 mM ABTS ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ร่วมกับ substrate buffer ปริมาณ 12.5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วหยด ABTS ซับสเตรท ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทุกหลุม จากนั้นปิดปากหลุมด้วย acetate plate sealer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งเขย่าไปด้วย ภายในเวลา 15-20 นาที สีของสาร ที่อยู่ในเพลทจะเปลี่ยนแปลงไปโดยสีจะเข้มขึ้นเรื่อยๆ

3.9 การอ่านเพลท

นำเพลทที่มีสีเข้มขึ้นจนเหมาะสมที่จะอ่านค่าได้ ดังภาพ 20 ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยพิจารณาจากค่าความทึบแสง (optical density; OD) ที่หลุม A2 ให้มีค่าน้อยกว่าซึ่งใกล้เคียง 1 หรือเท่ากับ 1



ภาพ 20 ลักษณะเพลทที่มีสีเข้มขึ้นจนเหมาะสมที่จะอ่านค่าได้

ความไว (sensitivity) ของการวิเคราะห์นี้ สามารถตรวจหาปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลที่น้อยที่สุดได้ที่ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ส่วนสัมประสิทธิ์ของความแปรผันของข้อมูลแต่ละหลุม (intra-assay coefficients of variation) มีค่าร้อยละ 5.4 ในขณะที่สัมประสิทธิ์ของความแปรผันของข้อมูลแต่ละเพลท (inter-assay coefficients of variation) มีค่าร้อยละ 9.5 ซึ่งความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในอุจจาระแสดงออกมาในหน่วยนาโนกรัมของปริมาณคอร์ติซอลต่อกรัมของ

น้ำหนักอุจจาระแห้ง (ng/g dry fecal matter) ซึ่งสามารถแยกวิเคราะห์คอร์ติซอลได้ทั้งหมดร้อยละ 100 โดยไม่จับกับสารเมตาบอไลต์ของคอร์ติซอลเลย (Young *et al.*, 2004)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SAS 9.2 (Statistical Analysis Software; SAS Institute Inc., North Carolina, USA) โดยการวิเคราะห์ข้อมูลแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1) ปริมาณการกินอาหารและน้ำ และการประเมินความปวด

แสดงผลของปริมาณการกินอาหารและน้ำของกระต่ายแต่ละกลุ่มทุก 24 ชั่วโมง ภายหลังการศัลยกรรม โดยคิดเป็นร้อยละของปริมาณการกินอาหารและน้ำใน 24 ชั่วโมง ก่อนการศัลยกรรม ในขณะที่ข้อมูลการประเมินความปวดจากการตอบสนองทางพฤติกรรมด้วยมาตราส่วนประมาณค่าแบบตัวเลข แสดงผลออกมาเป็นคะแนนความปวดในกระต่าย และข้อมูลการประเมินความปวดจากการตอบสนองทางสรีรวิทยาด้วยการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในอุจจาระในกระต่ายแต่ละกลุ่มทุก 12 ชั่วโมง ทั้งก่อนและหลังการศัลยกรรม โดยแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($\text{mean} \pm \text{standard error of mean; SEM}$)

นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มทดลองและระหว่างเวลาในการทดลอง ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนเมื่อมีการวัดซ้ำ (repeated measures ANOVA) โดยปัจจัยที่ได้ทำการศึกษาประกอบด้วย กลุ่มยาหลอก กลุ่มยาที่พอกชาลิน I และกลุ่มยาที่พอกชาลิน II ร่วมกับ เวลาที่ 12 และ 0 ชั่วโมง ก่อนศัลยกรรม และ 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง ภายหลังศัลยกรรม ซึ่งมีการเปรียบเทียบระหว่างคู่ของกลุ่มทดลองที่เวลาต่างๆ และทำการวิเคราะห์ซ้ำด้วย Bonferroni test เพื่อยืนยันผลของค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งกำหนดระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ alpha มีค่าเท่ากับ 0.05

2) ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างผลการประเมินความปวดต่อการตอบสนองด้านพฤติกรรม และด้านสรีรวิทยา

นำข้อมูลการประเมินความปวดต่อการตอบสนองด้านพฤติกรรม ที่แสดงผลออกมาเป็นคะแนนความปวด มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับข้อมูลการประเมินความปวดต่อการตอบสนองด้านสรีรวิทยา ที่แสดงผลออกมาเป็นระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในอุจจาระด้วย Pearson Correlation Coefficient ซึ่งกำหนดระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ alpha มีค่าเท่ากับ 0.05