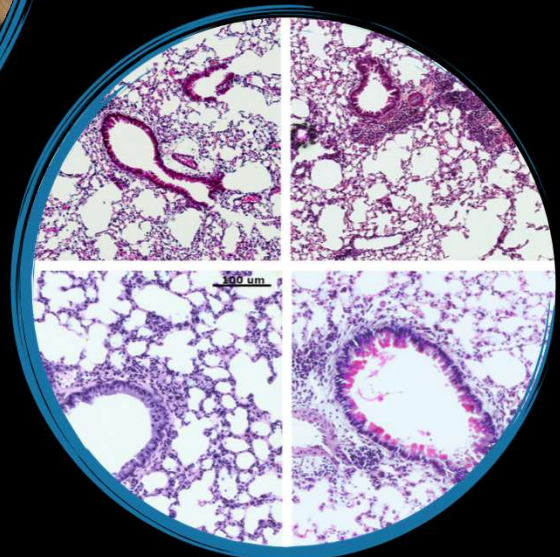


2025

คู่มือปฏิบัติงาน

การจำลองโรคหอบหืดแบบ
เฉียบพลันจากภูมิแพ้ในหนู
ทดลองโดยการกระตุ้นด้วย
โปรตีนจากไข่ขาว

LABORATORY MANUAL FOR OVALBUMIN (OVA)-INDUCED ACUTE ALLERGIC ASTHMA MOUSE MODEL



นายชัยพิชิต พยงค์

ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

คู่มือการปฏิบัติงาน

การจำลองโรคหอบหืดแบบเฉียบพลันจาก
ภูมิแพ้ในหนูทดลองโดยการกระตุ้นด้วย
โปรตีนจากไข่ขาว

Laboratory manual for ovalbumin
(OVA)-induced acute allergic asthma
mouse model

Online Document

นายชัยพิชิต พยงค์

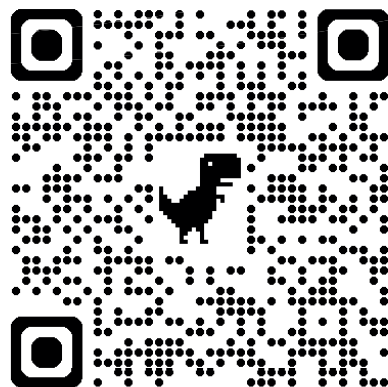
Chaiphichit.pha@mahidol.ac.th

ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

2025



https://drive.google.com/file/d/13A-CmIBX2FLCxBS4Qb_IX8O-ywZ0YMd8/view?usp=drive_link

คำนำ

หอบหืดเป็นอาการของโรคภูมิแพ้ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นผลมาจากการอักเสบเรื้อรังของทางเดินหายใจ ทำให้เกิดอาการหอบหายใจลำบากเนื่องจากการหดตัวของกล้ามเนื้อรอบหลอดลม ในรายที่มีอาการเรื้อรังจะทำให้ผนังเยื่อชั้นในของหลอดลมมีการหนาตัวและตีบตันทำให้ยากแก่การรักษา ผู้ป่วยหอบหืดจะมีอาการหายใจลำบากอ่อนเพลียเหนื่อยง่ายเป็นอุปสรรคต่อการมีคุณภาพชีวิตที่ดี หอบหืดเป็นโรคที่ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ มีผู้ป่วยหอบหืดกว่า 300 ล้านคนทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้วหรือกำลังพัฒนา ถือเป็นหนึ่งปัญหาสุขภาพของโลกที่ก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก สาเหตุของการเกิดโรคหอบหืดนั้นหลักๆ เกี่ยวข้องกับการตอบสนองที่รุนแรงของระบบภูมิคุ้มกัน (hyper reactivity) ที่มีต่อสารก่อภูมิแพ้ชนิดต่าง ๆ (allergens) ผ่านทางระบบหายใจ โดยมีปัจจัยเกื้อหนุนอื่น ๆ เช่น ปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic predisposition) และสิ่งแวดล้อม (environmental factor) สำหรับการรักษาเน้นเบื้องต้นต้องใช้ยาขยายหลอดลม (bronchodilator) เพื่อช่วยลดอาการหอบหืด การควบคุมโรคในระยะยาวต้องใช้ยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) กลุ่ม steroids เพื่อลดอาการแพ้และการอุบัติซ้ำของโรค (recurrent) อย่างไรก็ตาม โรคหอบหืดยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ อีกทั้งยาที่มีอยู่มีราคาแพงและส่งผลกระทบต่อสุขภาพในระยะยาวของผู้ป่วย ดังนั้นการค้นพบและพัฒนาการรักษาโรคหอบหืดจึงมีความจำเป็นเป็นอย่างมาก เนื่องจากโรคหอบหืดเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันการจำลองโรคจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำในสิ่งมีชีวิตที่มีระบบภูมิคุ้มกันทำงานเป็นปกติ การใช้สัตว์ทดลองจึงมีความสำคัญและจำเป็นสำหรับการค้นคว้าวิจัยทางด้านเภสัชวิทยาและชีววิทยาภูมิคุ้มกันอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

คู่มือเล่มนี้จะแสดงกระบวนการวิจัยและวิธีปฏิบัติงานเพื่อให้ได้หนูทดลองที่แสดงพยาธิสภาพใกล้เคียงกับโรคหอบหืดในคน โดยเริ่มจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์ (mouse) ให้เกิดการต่อต้านโปรตีนจากไข่ขาว (ovalbumin) ด้วยการฉีดทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) จากนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดอาการแพ้ผ่านทางระบบหายใจ (allergic airway disease) ด้วยการให้สูดดมละอองไข่ขาว เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะมีการเก็บเลือดเพื่อวัดระดับของสารส่งเสริมการอักเสบต่างๆ และเก็บน้ำล้างปอดเพื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกัน จากนั้นเนื้อปอดจะถูกเก็บเพื่อตรวจการอักเสบของหลอดลมและการเจริญของเซลล์เยื่อเมือก (goblet cell) รวมทั้งดูการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดลม (airway remodeling) เป็นต้น

ผู้เขียนหวังว่าคู่มือการปฏิบัติการเล่มนี้จะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาโรคหอบหืดและโรคภูมิแพ้อื่น ๆ ตลอดจนการพัฒนาที่สามารถนำไปใช้ได้จริงในอนาคต สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยและข้าพเจ้าขอขอบคุณกำลังใจจากเพื่อนร่วมงานทุกๆ คนไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นายชัยพิชิต พยงค์

ผู้จัดทำ

	หน้า
1. บทนำ	4
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	4
1.2 วัตถุประสงค์	8
1.3 ขอบเขต	8
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
2. บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ	9
2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง	9
2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ	9
2.3 โครงสร้างการบริหารจัดการ	13
3. หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข	14
3.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน	14
3.2 วิธีการปฏิบัติงาน	16
3.3 ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน	20
3.4 แนวคิด/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
4. เทคนิคในการปฏิบัติงาน	24
4.1 กิจกรรม/แผนปฏิบัติงาน	24
4.2 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	24
4.3 วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน	34
4.4 จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน	40
5. ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน	42
5.1 ข้อเสนอแนะ	45
5.2 ตัวอย่างกรณีศึกษา	46
บรรณานุกรม	53

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ตัวอย่างการใช้วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคหอบหืดในหนู	19
2	ตัวอย่างการใช้วัสดุและอุปกรณ์สำหรับเก็บผลการทดลองหลังสิ้นสุดกระบวนการ	20
3	ตัวอย่างการกำหนดจุดฉีดและการฉีดผ่านทางช่องท้องในหนูทดลอง	26
4	ตัวอย่างการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคหอบหืดผ่านทางเดินหายใจในหนูทดลอง	27
5	การตัดผิวหนังบริเวณหลอดลมหนูทดลองเพื่อทำการเปิดหลอดลม	29
6	หลอดลมที่ปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดเรียบและหลอดลมที่เลาะเนื้อเยื่อออกแล้ว	29
7	การร้อยเส้นด้ายเข้าใต้หลอดลมเพื่อใช้ผูกท่อสวนล้างหลอดลม	29
8	การตัดเจาะหลอดลมด้านบนให้เป็นรูด้วยการใช้กรรไกรผ่าตัด	30
9	การสอดท่อสวนล้าง catheter และการมัดหลอดลม	30
10	การล้างปอดและทางเดินหายใจ (bronchoalveolar lavage: BAL)	31
11	การผ่าตัดเปิดหน้าท้องหนูทดลองเพื่อหาเส้นเลือดดำใหญ่	32
12	การผ่าตัดเปิดช่องทรวงอกของหนูทดลองเพื่อเก็บเนื้อเยื่อปอด	33
13	ตัวอย่างเซลล์จากน้ำล้างปอดของหนูทดลองที่ย้อมด้วยสีย้อม Dip Quick ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์	35
14	เนื้อเยื่อปอดจากหนูทดลองที่เป็นโรคหอบหืดย้อมด้วยชุดย้อม H&E ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์	36
15	เนื้อเยื่อปอดจากหนูทดลองที่เป็นโรคหอบหืดย้อมด้วยชุดย้อม PAS ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์	37
16	ตัวอย่างกราฟเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ในน้ำล้างปอดระหว่างกลุ่มหนูปกติและหนูโรคหอบหืด	38
17	ตัวอย่างกราฟเปรียบเทียบระดับ TH2 cytokines และ IgE ในเลือด	38
18	ตัวอย่างกราฟแสดงการแทรกซึมของเซลล์อักเสบและการเจริญของเซลล์ผลิตเยื่อเมือกในปอด	39
19	การวิเคราะห์เซลล์และไซโตไคน์ในน้ำล้างปอด	47
20	การอักเสบของทางเดินหายใจและการแทรกซึมของเซลล์อักเสบ	48
21	การผลิตเมือกและภาวะ goblet cells hyperplasia ในปอด	49
22	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเดินหายใจและการสะสมของคอลลาเจน	49
23	ความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำล้างปอด	51
24	ภาพของเยื่อเนื้อปอดภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ ย้อมด้วยสี H&E และ PAS	51
25	ระดับของไซโตไคน์ชนิด TH2 (IL-5, IL-13) ในซีรัมและในน้ำล้างปอด	52

คู่มือการปฏิบัติงาน

การจำลองโรคหอบหืดแบบเฉียบพลันจากภูมิแพ้ในหนูทดลองโดยการกระตุ้นด้วยโปรตีนจากไข่ขาว

(Laboratory manual for ovalbumin (OVA)-induced acute allergic asthma mouse model)

The protocol outlined by Kunikata T et al. (2005)² and Schmidt M and Mattoli S (2013)³

1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

1.1.1 โรคหอบหืดและกลไกการเกิดโรค⁴⁻⁷

โรคหอบหืดจากภูมิแพ้ (allergic asthma) เป็นโรคเรื้อรังของทางเดินหายใจที่พบได้บ่อย โดยมีลักษณะเด่นคือการอักเสบเรื้อรังของหลอดลมซึ่งทำให้หลอดลมไวต่อสิ่งกระตุ้นมากขึ้น ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการหอบ หายใจลำบาก แน่นหน้าอก และไอเรื้อรัง โรคหอบหืดจากภูมิแพ้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune response) กลไกการเกิดโรคส่วนใหญ่เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ TH2 (helper type 2 T cell) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เกี่ยวข้องกับเซลล์หลายชนิด ไซโตไคน์ (cytokine) เคโมไคน์ (chemokine) และโปรสตาแกลนดิน (prostaglandin) เมื่อร่างกายสัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ เช่น เกสรดอกไม้ ไรฝุ่น หรือขนสัตว์ ระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์ TH2 ที่ตรวจพบสารก่อภูมิแพ้เซลล์เหล่านี้จะแบ่งตัวและหลั่งไซโตไคน์ ชนิด TH2 โดยเฉพาะอินเตอร์ลิวคิน-4 (interleukin-4, IL-4) ซึ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนาเซลล์ TH2 และมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์ B (B cell) สร้างแอนติบอดี เช่น IgE (immunoglobulin E, IgE) ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้จะไปจับกับอยู่กับเซลล์มาสต์เซลล์ (mast cell) และเบโซฟิล (basophil) เมื่อสารก่อภูมิแพ้มาสัมผัสกับแอนติบอดี จำเพาะที่อยู่บนผิวเซลล์ก็จะกระตุ้นให้เซลล์หลั่งสารสื่ออักเสบต่างๆ เช่น ฮิสตามีน (histamine) ลิวโคทรีน (leukotriene) และโปรสตาแกลนดิน ซึ่งสารสื่ออักเสบเหล่านี้จะทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในหลอดลม การบวมของเยื่อหลอดลม และเพิ่มการหลั่งเมือก ส่งผลให้เกิดอาการหอบ หายใจลำบาก และแน่นหน้าอก นอกจากนี้ยังมีไซโตไคน์อื่นๆ ที่หลั่งจากเซลล์ TH2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในหลอดลม ได้แก่

- **IL-5:** เป็นปัจจัยหลักที่กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเซลล์อีโอซิโนฟิล (eosinophil) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อหลอดลมในโรคหอบหืด
- **IL-9:** มีผลต่อเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการแพ้ เช่น มาสต์เซลล์ เซลล์ B และเซลล์เยื่อเมือก
- **IL-13:** มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมและต่อมสร้างเมือก

ไซโตไคน์เหล่านี้จะส่งเสริมการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อในหลอดลมทำให้หลอดลมไวต่อสิ่งกระตุ้นมากขึ้น นอกจากนี้ เคโมไคน์ซึ่งหลั่งออกมาจากเซลล์หลายชนิด ยังมีบทบาทสำคัญในการดึงดูดเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในโรคหอบหืดเข้ามาในบริเวณหลอดลม ตัวอย่างเช่น เซลล์ iNKT (invariant natural killer T cell) และ ILC2 (group 2 innate lymphoid cell) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกลไกการเกิดโรคหอบหืดจากภูมิแพ้ เซลล์ทั้งสองชนิดสามารถสร้างไซโตไคน์ชนิดต่างๆ รวมถึง IL-4, IFN-gamma, IL-5 และ IL-13 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ชนิด TH2 ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคหอบหืด เนื่องจากเซลล์เหล่านี้สามารถสร้างไซโตไคน์ชนิด TH2 ได้ในปริมาณมาก จึงสามารถทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงในหลอดลมได้

1.1.2 การจำแนกประเภทของโรคหอบหืด

โดยทั่วไปโรคหอบหืดถูกจัดอยู่ในกลุ่มโรคเรื้อรัง แต่สามารถแบ่งออกเป็นสองรูปแบบหลักตามระยะเวลาและความรุนแรงของอาการ ได้แก่

1.1.2.1 โรคหอบหืดเฉียบพลัน

โรคหอบหืดเฉียบพลัน (acute asthma) คือภาวะที่โรคหอบหืดกำเริบอย่างรวดเร็วและรุนแรงจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสารก่อภูมิแพ้หรือปัจจัยกระตุ้นอื่นๆ ทำให้หลอดลมหดเกร็งอย่างรุนแรงและเกิดการอักเสบอย่างรวดเร็ว ผู้ป่วยจะหายใจลำบากเป็นอย่างมาก มีอาการหอบ หายใจมีเสียงหวีด แน่นหน้าอกจนพูดไม่ได้ และอาจมีเหงื่อออก ตัวเย็น และใจสั่น โดยอาการสามารถบรรเทาลงได้ด้วยการรักษาที่เหมาะสม โรคหอบหืดเฉียบพลันมักเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีโรคหอบหืดเรื้อรังอยู่แล้ว โดยปัจจัยกระตุ้นต่างๆ เช่น การติดเชื้อ การสัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ หรือการออกกำลังกายอย่างหนัก อาจทำให้เกิดการกำเริบของโรคหอบหืดเรื้อรังจนกลายเป็นโรคหอบหืดเฉียบพลันได้ ในระยะการอักเสบแบบเฉียบพลันนี้ จะมีการตอบสนองอย่างรุนแรงของระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์อีโอซิโนฟิลและระดับของสารสื่ออักเสบที่สูงมาก

1.1.2.2 โรคหอบหืดเรื้อรัง

โรคหอบหืดเรื้อรัง (chronic asthma) คือภาวะที่มีอาการของโรคหอบหืดเกิดขึ้นซ้ำๆ เป็นระยะเวลานาน เกิดจากการอักเสบเรื้อรังของหลอดลม มีการเปลี่ยนแปลงของระบบโครงสร้างของผนังหลอดลม (airway remodeling) อย่างชัดเจน ทำให้หลอดลมไวต่อสิ่งกระตุ้นมากขึ้น และง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้หรือปัจจัยกระตุ้นอื่นๆ โดยมักมีการกำเริบขึ้นๆ ลงๆ ตั้งแต่ระดับปานกลางถึงรุนแรง อาการที่พบบ่อยได้แก่ หอบ หายใจลำบาก แน่นหน้าอก และไอ โดยเฉพาะในช่วงกลางคืนหรือหลังออกกำลังกาย ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังที่ต้องได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่อง

1.1.2.3 ความแตกต่างระหว่างโรคหอบหืดเฉียบพลันและเรื้อรัง

ลักษณะ	โรคหอบหืดเฉียบพลัน	โรคหอบหืดเรื้อรัง
การเริ่มต้นของอาการ	เกิดขึ้นอย่างฉับพลันและรุนแรง	เกิดขึ้นซ้ำๆ เป็นระยะเวลานาน
ความรุนแรงของอาการ	รุนแรงมาก อาจเป็นอันตรายถึงชีวิต	อาจมีตั้งแต่ระดับปานกลางถึงรุนแรง
ระยะเวลา	สั้น อาการมักบรรเทาลงได้ด้วยการรักษา	ยาวนาน อาจมีการกำเริบซ้ำๆ
กลไก	ระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองอย่างรุนแรงต่อสิ่งกระตุ้น	การอักเสบเรื้อรังของหลอดลม

1.1.3 แนวทางการรักษาโรคหอบหืดจากภูมิแพ้⁷⁻⁹

1.1.3.1 การวินิจฉัยและการรักษา

แพทย์จะพิจารณาประวัติทางคลินิก การตรวจร่างกาย และการตรวจเพิ่มเติม เช่น การทำงานของปอด (pulmonary function test) การไหลของอากาศภายในปอด (peak expiratory flow rate, PEFr) และการตรวจเลือดเพื่อหาค่า IgE การรักษาโรคหอบหืดจากภูมิแพ้มีเป้าหมายเพื่อควบคุมอาการ ลดความรุนแรงของโรค และป้องกันภาวะแทรกซ้อน ซึ่งวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือการระบุชนิดของสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้และหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสารเหล่านั้น หากไม่เพียงพอแพทย์อาจแนะนำการรักษาทางการแพทย์หรือการใช้ยาซึ่งขึ้นอยู่กับ

กับความรุนแรงของโรคและความถี่ของอาการ ยาที่ใช้ในการรักษา ได้แก่

- ยาขยายหลอดลม (bronchodilator) ใช้เพื่อบรรเทาอาการหอบและหายใจขัดในทันที สามารถแบ่งออกเป็นยาที่ออกฤทธิ์เร็วและยาที่ออกฤทธิ์นาน (short/long-acting beta-2 agonists) สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการกำเริบไม่บ่อย อาจไม่จำเป็นต้องใช้ยาอื่นเพิ่มเติม
- ยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory drug) ใช้เพื่อลดการอักเสบในหลอดลม เช่น ยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการกำเริบมากกว่าสองครั้งต่อสัปดาห์แพทย์อาจแนะนำให้ใช้ยาสเตียรอยด์ชนิดสูดดมขนาดต่ำ หรือยาต้านตัวรับลิวโคทริน (leukotriene receptor antagonists) หรือยาต้านเซลล์มาสต์เซลล์ สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการกำเริบทุกวันอาจต้องใช้ยาสเตียรอยด์ชนิดสูดดมในขนาดที่สูงขึ้น หรือในกรณีที่เกิดภาวะกำเริบของโรคหอบหืดอย่างรุนแรง อาจจำเป็นต้องใช้ยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ชนิดรับประทานร่วมกับยาอื่นๆ ด้วย
- ยาอื่นๆ เช่น ยาเสริมภูมิคุ้มกัน และยาชีวภาพ (biologic) เป็นต้น

1.1.3.2 ปัจจัยเสี่ยงและข้อจำกัด

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคหอบหืดจากภูมิแพ้ ได้แก่ พันธุกรรม มีการพบว่ายีนบางชนิดมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคหอบหืดในแต่ละบุคคล การสัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ในปริมาณมาก เช่น ไรฝุ่น เกสรดอกไม้ มลพิษทางอากาศ การสูบบุหรี่ และการติดเชื้อในวัยเด็ก ช่วยส่งเสริมให้เกิดภาวะการตอบสนองที่รุนแรงของระบบภูมิคุ้มกันและนำไปสู่การพัฒนาของโรคได้ ปัจจัยอื่นๆ เช่น น้ำหนักเกิน โรคกรดไหลย้อน และการใช้กำลังอย่างหนัก สามารถทำให้เกิดการกำเริบของโรคอย่างรุนแรงซึ่งอาจทำให้หายใจไม่ออกและเสียชีวิตได้ นอกจากนี้โรคหอบหืดยังมีภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญ เช่น การเพิ่มความถี่ต่อการติดเชื้อในทางเดินหายใจ การอักเสบเรื้อรังของหลอดลม ซึ่งทำให้ร่างกายอ่อนแอและส่งผลต่อการทำงานของปอดในระยะยาว นอกจากนี้การใช้ยากดภูมิคุ้มกันในปริมาณมาก โดยเฉพาะยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ ยังมีผลข้างเคียงที่ร้ายแรงหลายอย่าง เช่น โรคกระดูกพรุน การเผาผลาญผิดปกติ และโรคต่อหีน เป็นต้น การทำความเข้าใจกลไกการเกิดโรคอย่างละเอียดเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งต่อการวางแผนการรักษาและการป้องกันโรค

1.1.4 สถานการณ์โรคหอบหืดในประเทศไทย¹⁰⁻¹²

โรคหอบหืดพบได้บ่อยในประเทศไทย จากรายงานการสำรวจของกรมควบคุมโรคในช่วงปี พ.ศ. 2559-2562 มีอัตราความชุกอยู่ที่ประมาณ 830.9 ± 9.4 ต่อประชากร 100,000 คน และลดลงเหลือ 737.99 ต่อประชากร 100,000 คน ในปี 2563 แม้ว่าจำนวนผู้ป่วยจะลดลง แต่กลับพบว่าอัตราการเสียชีวิตและจำนวนครั้งการเข้ารับการรักษาต่อผู้ป่วย 1 รายกลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา แนวทางการรักษาโรคหอบหืดในประเทศไทย (อ้างอิงตาม Global Initiative for Asthma, GINA) เน้นการใช้ยาคอร์ติโคสเตียรอยด์แบบสูดดม และยาขยายหลอดลมแบบออกฤทธิ์เร็วเป็นหลัก สำหรับอาการหอบหืดที่ยากต่อการควบคุม อาจจำเป็นต้องใช้ยาเพิ่มเติม เช่น ยาแซนทีน (xanthine) ยาต้านตัวรับลิวโคทริน ยาต้านตัวรับมัสคารินิกแบบออกฤทธิ์นาน (long-acting muscarinic antagonists) ยาคอร์ติโคสเตียรอยด์แบบรับประทาน และยาชีวภาพ ตามลำดับ

ค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคหอบหืด จากรายงานในปี 2555 ค่าใช้จ่ายโดยตรงต่อผู้ป่วย 1 รายต่อปีอยู่ที่ประมาณ 33,024 บาท ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 19.14 ของผลิตภัณฑ์มวลรวมภายในประเทศ (GDP) ต่อหัวประชากร โดยไม่รวมการใช้จ่าย

ขั้นสูงและค่าใช้จ่ายทางอ้อมอื่นๆ โรคหอบหืดจึงอาจกลายเป็นภาระทางเศรษฐกิจที่สำคัญสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา การบริหารจัดการโรคหอบหืดในประเทศไทยยังคงต้องพัฒนาในทุกด้าน เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่มีประสิทธิภาพและลดภาระทางเศรษฐกิจของโรคนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการเข้าถึงยาและการดูแลผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น การค้นหาวิธีการรักษาโรคหอบหืดจากภูมิแพ้จึงยังมีความจำเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ การเพิ่มความรู้และความตระหนักเกี่ยวกับโรคหอบหืดในหมู่ประชาชนและผู้ป่วยก็เป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันและควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.1.5 แนวทางการพัฒนาการรักษาโรคหอบหืดในอนาคต

1.1.5.1 ความสำคัญของการศึกษาระบบของโรค^{13,14}

โรคหอบหืดเป็นโรคที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยา ซึ่งขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและการกระตุ้นระหว่างการพัฒนาของโรค ในกรณีส่วนใหญ่การเพิ่มขึ้นของเซลล์ TH2 เป็นสาเหตุหลักของโรคหอบหืดจากภูมิแพ้และมีอีโอซิโนฟิลเป็นตัวการสำคัญในการแสดงออกของโรค การค้นหาแนวทางการรักษาที่มุ่งเน้นการยับยั้งการทำงานของเซลล์ TH2 และไซโตไคน์ประเภทที่ 2 จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและมีความสำคัญ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาใหม่ๆ หลายชนิดขึ้นมาโดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อการทำงานของไซโตไคน์ TH2 เช่น IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-13 เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังมีผู้ป่วยโรคหอบหืดอีกจำนวนมากที่ไม่ได้รับประโยชน์จากรักษาด้วยยาแอนติบอดี หรือไม่สามารถเข้าถึงการรักษาที่มีค่าใช้จ่ายสูง จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าการระบุชนิดหรือรายละเอียดย่อยของการเกิดโรคหอบหืดอย่างครบถ้วน เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนาระบบการรักษาโรค ดังนั้นการค้นหาวิธีการรักษาโรคหอบหืดอื่นๆ ก็ยังคงมีความสำคัญไม่แพ้กัน

1.1.5.2 การจำลองโรคหอบหืดในสัตว์ทดลอง¹⁵⁻²⁰

การทำความเข้าใจกลไกการเกิดโรคหอบหืดนั้นมีความสำคัญต่อการค้นหาแนวทางการรักษาใหม่ๆ จากการศึกษางานวิจัยในอดีตจนถึงปัจจุบัน พบว่าโมเดลหนูทดลองสามารถจำลองลักษณะหลายอย่างของโรคภูมิแพ้ที่คล้ายคลึงกับมนุษย์ได้ โดยเฉพาะโรคทางระบบภูมิคุ้มกันรวมถึงโรคหอบหืดด้วย โมเดลสัตว์ทดลองเป็นเครื่องมือที่จำเป็นมากสำหรับการศึกษาโรคหอบหืดจากการแพ้ ซึ่งจำเป็นจะต้องทำการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหรือระบบอินวิโว (in-vivo system) โดยหลักการก็คือการกระตุ้นหนูทดลองให้เกิดการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ และจากนั้นก็จะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านและการอักเสบในระบบทางเดินหายใจ สารก่อภูมิแพ้ที่นิยมคือโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ได้แก่ เกสรดอกไม้ (pollen) โปรตีนจากแมลง เช่น แมลงสาบและไรฝุ่น และโปรตีนจากอาหาร เช่น ไข่ เป็นต้น หนึ่งในโปรตีนก่อภูมิแพ้ที่มีราคาถูกและใช้อย่างแพร่หลายคือ โอวัลบูมิน (ovalbumin: OVA) เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่พบมากที่สุดไข่ขาวของไก่ โอวัลบูมินมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและมีขนาดใหญ่พอที่จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะเจาะจงได้ และสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของทางเดินหายใจผ่านการทำงานของ IgE ที่จำเพาะต่อ OVA ได้ โดยโมเดลหนูทดลองนี้สามารถจำลองลักษณะสำคัญของการอักเสบของทางเดินหายใจเนื่องจากภูมิแพ้ที่พบในโรคหอบหืดของมนุษย์ได้ เช่น การเพิ่มขึ้นของอีโอซิโนฟิลในหลอดลม การผลิตไซโตไคน์ TH2 (IL-4, IL-5 และ IL-13) และการปรับโครงสร้างของทางเดินหายใจ (airway remodeling) การกระตุ้นหนูทดลองด้วย OVA นี้สามารถจำลองได้ทั้งการอักเสบของทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน (acute asthma) และแบบเรื้อรัง (chronic asthma) ได้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อใช้เป็นคู่มือในการศึกษาวิธีการกระตุ้นหนูทดลองให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนก่อภูมิแพ้ และการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้และการอักเสบในระบบทางเดินหายใจ

1.2.2 เพื่อใช้เป็นคู่มือในการสร้างโมเดลจำลองโรคหอบหืดชนิด TH2 ของมนุษย์ ในหนูทดลองด้วยการกระตุ้นด้วย โปรตีนโอวัลบูมิน OVA จากไข่ขาว

1.2.3 ใช้เป็นคู่มือในการวัดผลและประเมินผลการทดลองในการวิจัยการรักษาโรคหรืออาการของโรคหอบหืดที่เกิดจากภูมิแพ้ในสัตว์ทดลอง

1.2.4 เพื่อถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์การสร้างโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อการศึกษาและวิจัยโรคหอบหืดจากภูมิแพ้ให้นักศึกษา บัณฑิต อาจารย์ นักวิจัย หรือผู้สนใจทั่วไป

1.3 ขอบเขต

เป็นคู่มือการปฏิบัติงานของกลุ่มงานวิจัยด้านเภสัชวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunopharmacology) ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยจะกล่าวถึงวิธีการสร้างโมเดลโรคหอบหืดแบบเฉียบพลันในหนูทดลองด้วยโปรตีน OVA และการประเมินผลลัพธ์ทางชีววิทยาภูมิคุ้มกันและสรีรวิทยาของการอักเสบ โดยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ดังต่อไปนี้

1.3.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง โดยการฉีดสารประกอบของโปรตีน OVA ผ่านทางช่องท้องของหนูทดลองตามวันและระยะเวลาที่กำหนด เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันตื่นตัวด้วยการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับโรคภูมิแพ้ เช่น เซลล์ TH2 เซลล์อีโอซิโนฟิล เซลล์ B เซลล์ และเกิดการตอบสนองต่อต้านสิ่งแปลกปลอมด้วยการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน OVA

1.3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ในทางเดินหายใจของหนูทดลอง โดยการให้สูดดมละอองของสารละลาย OVA เพื่อกระตุ้นแอนติบอดีตัวรับ (IgE-receptor) ต่อโปรตีน OVA บนผิวของเซลล์แมสเซลล์ (mast cell) ให้ทำงานและปล่อยสารกระตุ้นการอักเสบต่างๆ รวมถึงการมาของเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่นๆ ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบและทำลายตัวของผนังเยื่อหลอดลม

1.3.3 การประเมินและวิเคราะห์ผลการทดลอง ด้วยการตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำล้างปอด (broncho alveolar lavage fluid: BAL fluid) การวัดปริมาณสารไซโทไคน์ชนิด TH2 ใน BAL fluid การวัดปริมาณ IgE ในเลือด และการตรวจสอบเนื้อเยื่อปอด เพื่อดูการกระจายตัวของเซลล์อักเสบและการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหลอดลม

นอกจากนี้ยังกล่าวถึงปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ระหว่างการปฏิบัติงาน รวมถึงข้อเสนอแนะและแนวทางการแก้ไข พร้อมยกตัวอย่างกรณีศึกษาในงานวิจัย โดยคู่มือเล่มนี้จะไม่ได้กล่าวถึงการวัดหรือประเมินผลทางคลินิกของระบบการหายใจที่เกิดจากอาการหอบหืดกำเริบจากภูมิแพ้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถสร้างโมเดลหนูทดลองเพื่อจำลองการเกิดโรคหอบหืดจากภูมิแพ้เพื่อการศึกษาและวิจัย

1.4.2 เพื่อเป็นประโยชน์แก่นักศึกษาและนักวิจัยที่สนใจจะนำเทคนิคนี้ไปเป็นแบบอย่างในงานวิจัย

1.4.3 สามารถนำโมเดลไปพัฒนาต่อยอดเพื่องานที่เกี่ยวข้องได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

ปฏิบัติงานในฐานะนักวิทยาศาสตร์ด้านชีววิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ภาระงานหลักคือทำงานวิจัยด้านชีววิทยาภูมิคุ้มกัน รวมถึงงานวิจัยพรีคลินิก (preclinical research) ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบที่มีความเป็นไปได้ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อการรักษาโรค เช่น โรคภูมิแพ้ หอบหืด โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง และโรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันบกพร่อง อย่างเช่น โรคมะเร็ง เป็นต้น จบการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตทางด้านชีววิทยาทางการแพทย์ (medical biology) รวมทั้งความรู้ทางสาขาวิชาระบบภูมิคุ้มกัน (immunology) มีความรู้ความสามารถที่เกี่ยวข้องกับงานที่ปฏิบัติ มีความชำนาญและประสบการณ์หลายด้าน รวมทั้งเทคนิคการทำงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน (basic science) มีประสบการณ์ในงานการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยเฉพาะการใช้หนูทดลองเพื่องานวิจัยทางด้านเภสัชวิทยาเพื่อการรักษาโรคหอบหืดที่เกิดจากโรคภูมิแพ้ การปฏิบัติงานในตำแหน่งหน้าที่เป็นงานที่ทำหายและความซับซ้อน ต้องใช้ความรู้ความสามารถที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการออกแบบและดำเนินการทดลองที่ซับซ้อน เพื่อป้องกันการวิเคราะห์ผิดพลาดให้น้อยที่สุด ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความสามารถในการคิดและวิเคราะห์และแก้ไขปัญหา สามารถปรับตัวเข้ากับการเปลี่ยนแปลงของสถานการณ์ รวมถึงมีความอดทนและความมุ่งมั่นสูงในการทำงาน เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล งานวิจัยช่วยให้มีความคล่องตัวและเกิดประสิทธิภาพในการปฏิบัติงานของสายวิชาการ ผลการทดลองที่ได้จะช่วยสนับสนุนงานวิจัยต่างๆ ที่เป็นความร่วมมือระหว่างสถาบันอื่นๆ ทั้งในประเทศและในระดับสากล ช่วยตอบสนองภารกิจหลักทางด้านวิชาการและด้านการวิจัยของภาควิชาและคณะ และอาจนำไปสู่การพัฒนาใหม่ในการรักษาโรคในอนาคต ทำให้เกิดผลงานที่เป็นรูปธรรม เช่น การตีพิมพ์ในระดับชาติและนานาชาติ การจดอนุสิทธิบัตรและสิทธิบัตร เป็นต้น

2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

2.2.1 งานวิจัย

หน้าที่ความรับผิดชอบหลักคือการทำงานวิจัยเพื่อศึกษาสารประกอบหรือตัวยาใหม่หรือที่มีอยู่แล้วเพื่อนำไปทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้รักษาโรคหอบหืด (asthma) หรือภูมิแพ้ (allergy) โดยใช้สัตว์ทดลอง เริ่มจากการวางแผนงานด้วยการศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งในอดีตและปัจจุบัน จากวารสารนานาชาติที่ได้รับการยอมรับและมีความน่าเชื่อถือ โดยงานวิจัยหลักมีจุดประสงค์ที่จะทดสอบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ตัวหนึ่งที่ได้รับการยืนยันจากสมุนไพรที่มีการใช้เพื่อบรรเทาอาการจากโรคหอบหืดในภูมิปัญญาท้องถิ่นโบราณ ผู้ปฏิบัติงานได้รับมอบหมายให้ทำการจำลองโมเดลหนูทดลองโรคหอบหืดให้สำเร็จ ก่อนที่จะทดสอบด้วยตัวยา ผู้เขียนได้ค้นคว้าข้อมูลเหตุผลและระเบียบและวิธีการปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลอง เพื่อยืนยันเรื่องประสานงานกับหน่วยจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง เพื่อทำการประเมินความถูกต้องเหมาะสม เพื่อป้องกันความผิดพลาดและเพื่อสวัสดิภาพของสัตว์ทดลอง โดยที่ผ่านมาสามารถผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง สามารถจำลองโรคหอบหืดในหนูทดลองได้สำเร็จ ทั้งโรคหอบหืดแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง และสามารถหาคำตอบจากโจทย์วิจัยได้เป็นผลสำเร็จ นอกจากนี้งานจะต้องใช้ทักษะความรู้ทางสถิติในการรวบรวมและประมวลผลการทดลอง เพื่อทดสอบหาค่าสำคัญทางสถิติและการนำเสนออย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ สามารถจัดทำคู่มือการปฏิบัติงานเพื่อ

ถ่ายทอดความรู้สู่ผู้ที่สนใจอันจะเกิดประโยชน์ต่องานที่เกี่ยวข้องต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่รับผิดชอบได้แก่

- การเลี้ยงเซลล์ T regulatory (Treg) เพื่อใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคมะเร็งหรือโรคแพ้ภูมิตนเอง (autoimmune disease) โดยมีการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน คัดเลือกเซลล์ที่ต้องการและกระตุ้นให้เจริญในจานเลี้ยงเพื่อใช้ในการวิจัยและทดสอบ
- การทดสอบสาร CDK inhibitors ต่อเซลล์ Treg เพื่อหาแนวทางในการจำกัดการทำงานของเซลล์ Treg ซึ่งเป็นเซลล์ตัวหลักที่กีดการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่นๆ ในการทำลายเซลล์แปลกปลอมหรือเซลล์มะเร็ง
- ปฏิบัติงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ CIK (cytokine induced killer cell) เพื่อให้มีประสิทธิภาพและความสะดวกมากขึ้นในการใช้งานทางการแพทย์

งานทั้งหมดล้วนเกี่ยวข้องกับเทคนิคทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ เช่น การเลี้ยงและปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลอง การผ่าตัดเก็บอวัยวะ การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว การเพาะเลี้ยงเซลล์ภูมิคุ้มกัน และการวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่องคัดแยกเซลล์ ฯลฯ การทำงานวิจัยยังต้องเกี่ยวข้องกับทักษะการทำงานอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น หลักการปฏิบัติงานและความปลอดภัยในห้องทดลองทางวิทยาศาสตร์ การพัฒนางานทางด้านคุณภาพห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน การทำงานกับสารเคมี การจัดการอย่างเป็นระบบ และทักษะทางงานวิทยาศาสตร์อื่นๆ เป็นต้น

2.2.2 งานสนับสนุนการเรียนการสอน

มีส่วนร่วมในงานการเรียนการสอนทั้งระดับปริญญาตรีและระดับบัณฑิตศึกษาของภาควิชาฯ เช่น ร่วมดูแลการสอนในรายวิชาเภสัชวิทยาปฏิบัติการเรื่องการตอบสนองของยาต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรและแพทย์แผนไทยประยุกต์ของคณะฯ ดูแลความเรียบร้อยของงานปฏิบัติงานในแล็บของนักศึกษาหลังปริญญาหรือผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องทั้งภายในและภายนอก ดูแลและสอนการใช้เครื่องมือต่างๆ ภายในแล็บ นอกจากนี้ยังมีการสอนเทคนิคพื้นฐานต่างๆ เช่น การเตรียมอุปกรณ์และสารต่างๆ เทคนิคการทำงานแบบปลอดเชื้อ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง สอนเทคนิคการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากน้ำเลือด และการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวให้เจริญเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ เช่น เซลล์ CIK เซลล์ TH2 และ เซลล์ iTreg เป็นต้น ให้แก่นักศึกษาระดับปริญญาโท/เอก หรือนักวิจัยจากหน่วยงานอื่นๆ นักเรียนฝึกปฏิบัติงาน ตลอดจนนักศึกษาต่างชาติ เพื่อให้บุคคลเหล่านั้นสามารถนำความรู้และเทคนิคต่างๆ ไปใช้ปฏิบัติงานได้จริง นอกจากนี้ยังช่วยให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคการทดลองกับสัตว์ทดลอง สอนการคำนวณต่างๆ การวิเคราะห์ข้อมูล การทดสอบด้านสถิติ และการนำเสนอโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ฯลฯ

2.2.3 งานบริการวิชาการ

ด้วยประสบการณ์และความเชี่ยวชาญในการทำงานวิจัยด้านชีววิทยาภูมิคุ้มกัน ณ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จึงสามารถให้บริการวิชาการในหลากหลายรูปแบบ เช่น ให้คำปรึกษาในด้านการออกแบบการทดลองทางวิทยาศาสตร์ การวิเคราะห์ข้อมูล และการตีความผลการทดลองทางด้านชีววิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น การวิเคราะห์ระดับไซโตไคน์ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน และการวิเคราะห์เซลล์ ในโรคมะเร็ง โรคหอบหืด และโรคภูมิคุ้มกันอื่นๆ ถ่ายทอดความรู้และเทคนิคทางด้านชีววิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น การแยกและการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว การทดลองในสัตว์ทดลอง การวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเซลล์ และการ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ แก่บุคลากร นักเรียน นักศึกษา หรือผู้ที่สนใจทั้งภายในและภายนอกหน่วยงาน การร่วมมือในการวิจัยกับหน่วยงานภายนอก เพื่อพัฒนาวิธีการรักษาโรคด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันใหม่ๆ หรือเพื่อตอบคำถามทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ รวมทั้งการเขียนงานวิจัย บทความทางวิชาการ และคู่มือต่างๆ

ความเชี่ยวชาญเฉพาะ:

- มีประสบการณ์ในการสร้างแบบจำลองหนูทดลองโรคหอบหืด และการทดสอบประสิทธิภาพของสารประกอบจากสมุนไพรในการรักษาโรค
- มีความเชี่ยวชาญในการเลี้ยงและวิเคราะห์เซลล์ Treg เพื่อศึกษาบทบาทของเซลล์ชนิดนี้ในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน
- มีประสบการณ์ในการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ CIK เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง
- เทคนิคทางห้องปฏิบัติการ เช่น การเลี้ยงเซลล์ การวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometry และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลงานที่ผ่านมา:

- Poster presentation and proceedings of 45th PTST International Meeting, 15-17 May 2024: Ovalbumin (OVA)-Induced Acute and Chronic Asthma Mouse Models, the simple but Complete In Vivo System for Airway Inflammation and Fibrosis Study, Proceedings of the 45th International Meeting of the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand. -- Bangkok: The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand, 2024, 140p, 1. Pharmacy, 1. Title, 615.1, ISBN 978-616-94260-1-1. p. 95-104. ²¹
- Chaiphichit Phayangkhe, Pornpimon Ek-eudomsuk, Kitipong Soontrapa. The bioflavonoid hispidulin effectively attenuates T helper type 2-driven allergic lung inflammation in the ovalbumin-induced allergic asthma mouse model, Respiratory Investigation, Volume 62, Issue 4, 2024, Pages 558-565, ISSN 2212-5345. ²²
- Pluangnooch P, Phayangkhe C, Soontrapa K. A comparison of cell-culture plasticwares for effective human cytokine-induced killer cell culture. Asian Pac J Allergy Immunol. 2023;41(4):401-406. ²³

2.2.4 งานพัฒนาคุณภาพ

- ดูแลความเรียบร้อยของห้องปฏิบัติการและเครื่องมือต่าง ๆ เช่น ตู้ปลอดเชื้อ ตู้เพาะเชื้อ ตู้เย็นชนิด 4, -20 และ -80 องศาเซลเซียส รวมทั้งบริหารจัดการใช้วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี ให้พร้อมและสอดคล้องตามระบบการจัดการของคณะ
- ร่วมอบรมทักษะและความรู้ทางห้องปฏิบัติการ จัดทำคู่มือวิธีการใช้งานของเครื่องมือต่างๆ (SOP) และให้คำแนะนำการใช้งานเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง เพื่อให้ผู้ใช้งานได้ผลการทดลองที่แม่นยำและช่วยยืดอายุการใช้งานของเครื่องมือ
- พัฒนารูปแบบการทำโมเดลสัตว์ทดลองและเขียนเป็นคู่มือ เช่น การจำลองโรคหอบหืดในหนูทดลอง

- เข้าร่วมการประชุมการนำเสนอความก้าวหน้าของงานวิจัย (progression report) รวมทั้งนำเสนอความก้าวหน้าของงานวิจัยเป็นภาษาอังกฤษ (laboratory meeting and journal club)
- ให้ความร่วมมือในงานอื่นๆ ที่ได้รับมอบหมาย

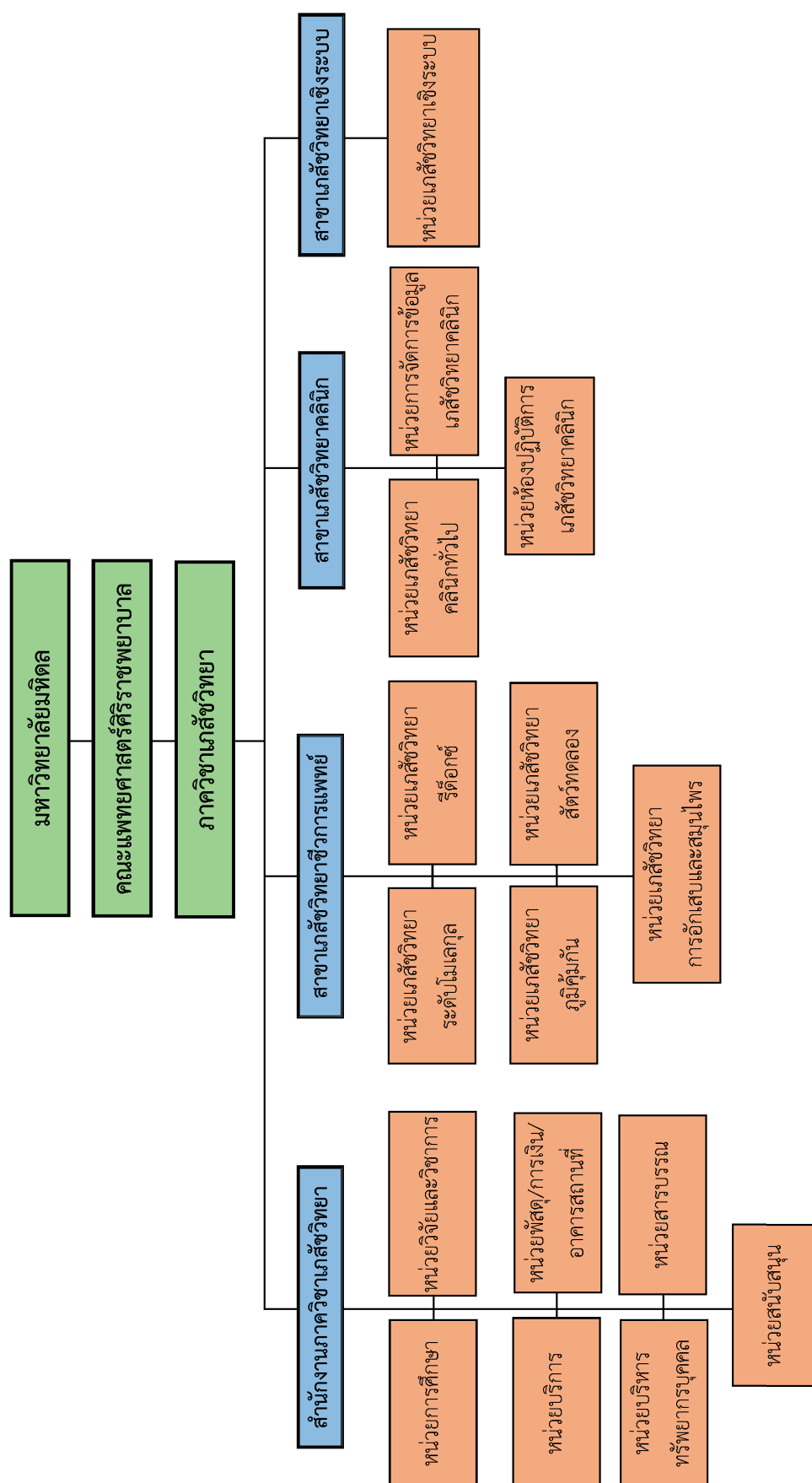
2.2.5 งานพัฒนาความรู้และทักษะ

- ร่วมกิจกรรมทางวิชาการต่างๆ เช่น การฟังการบรรยายของผู้เชี่ยวชาญ การนำเสนองานทางวิชาการของนักศึกษา และการเข้าร่วมอบรมทางวิชาการที่เป็นประโยชน์ในการปฏิบัติงาน
- เข้าร่วมงานประชุมวิชาการของคณะฯ/ภาควิชา เข้าร่วมอบรมมาตรการต่างๆ จากส่วนกลาง และเข้าร่วมการอบรมภาคปฏิบัติที่เป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงาน
- ร่วมอบรมการจัดการความรู้ในด้านต่างๆ (KM)

2.2.6 งานทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม

มีส่วนร่วมในงานพิธีการต่างๆ ที่จัดขึ้นทุกปีภายในภาควิชา เช่น งานทำบุญขึ้นปีใหม่ในหน่วยงาน กิจกรรมรดน้ำดำหัวผู้อาวุโส และทำบุญสงฆ์พระเนื่องในเทศกาลสงกรานต์ เป็นต้น ให้ความร่วมมือในการจัดกิจกรรมหรือการแสดงออกต่างๆ ที่เป็นการแสดงถึงวัฒนธรรมขององค์กรคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และเข้าร่วมในงานที่คณะฯ จัดขึ้นอยู่เสมอๆ ได้แก่ พิธีทำบุญตักบาตรเนื่องในวันเฉลิมพระชนมพรรษา งานวันมหิดล และวันสำคัญของคณะฯ เป็นต้น นอกจากนั้นยังร่วมงานงานในวันสำคัญในพระพุทธศาสนาต่างๆ เช่น งานเทศน์มหาชาติ งานถวายเทียนเข้าพรรษา งานถวายผ้าพระกฐิน ฯลฯ และงานประเพณีต่างๆ เช่น วันสงกรานต์ วันลอยกระทง เป็นต้น

2.3 โครงสร้างการบริหารจัดการ



ที่มา: โครงสร้างภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (ก.ย. 2563)

3. หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข

3.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน

การศึกษาวิจัยโดยใช้สัตว์ทดลองต้องอาศัยหลักเกณฑ์และเทคนิคหลายอย่างซึ่งจะมีผลที่เกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะการทดลองที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีความแปรผันได้ง่ายและเร็วต่อการกระตุ้น ดังนั้นจึงมีหลายปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการปฏิบัติงาน โดยเฉพาะเรื่องความสะอาดปราศจากการปนเปื้อนของวัสดุอุปกรณ์และสถานที่ปฏิบัติงาน รวมทั้งสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงสัตว์และสวัสดิภาพของตัวสัตว์ด้วยพอสมควรได้ดังนี้

3.1.1 ผู้ปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลองต้องผ่านการอบรมจริยธรรมการทำงานกับสัตว์ทดลอง และมีความรู้ความเข้าใจในเทคนิคการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลอง เช่น การเลี้ยงสัตว์ การจับสัตว์ การฉีดยา ฯลฯ ต้องผ่านการประเมินผลและมีใบอนุญาตทำงานที่ออกให้โดยสถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.) ภายใต้สังกัดสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

3.1.2 การกำหนดจำนวนสัตว์ทดลอง การออกแบบการทดลอง แผนการทำงาน และวิธีการที่จะกระทำหรือปฏิบัติกับสัตว์ทดลองต้องผ่านการตรวจสอบและพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ของหน่วยงานแต่ละสังกัด

3.1.3 ผู้ปฏิบัติงานต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด เช่น ห้ามรับประทานอาหาร เครื่องดื่ม หรือสูบบุหรี่ภายในห้องปฏิบัติการ และต้องสวมใส่ชุดป้องกันส่วนบุคคล เช่น เสื้อกาวน์ ถุงมือ และแว่นตาเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารเคมี และต้องล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่ก่อนและหลังการปฏิบัติงาน

3.1.4 ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้ความเข้าใจในหลักสุขอนามัยและความปลอดภัยทางชีวภาพอย่างครบถ้วน รวมถึงระบบการจัดการขยะและของเสียทางชีวภาพอย่างถูกวิธี เพื่อความปลอดภัยของบุคลากรและสิ่งแวดล้อม

3.1.5 ผู้ปฏิบัติงานจะต้องปฏิบัติตามหลักสุขอนามัยและความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด โดยเฉพาะการใช้เทคนิคปลอดเชื้อในการปฏิบัติงานทุกขั้นตอน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่อาจส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของผลการทดลอง นอกจากนี้ยังต้องใช้สารเคมีที่มีคุณภาพและผ่านการรับรอง รวมถึงต้องดูแลรักษาความสะอาดของอุปกรณ์เครื่องมือให้สะอาดปราศจากเชื้ออยู่เสมอด้วยวิธีการที่ได้มาตรฐาน

3.1.6 การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสารชีวภาพอันตราย หรือการเตรียมสารที่ต้องการควบคุมสิ่งปนเปื้อน ต้องดำเนินการภายในตู้ปลอดเชื้อระดับ 2 ตู้ปลอดเชื่อนี้ทำงานโดยการกรองอากาศผ่านแผ่นกรอง HEPA filter เพื่อกำจัดอนุภาคขนาดเล็กต่างๆ ทำให้ภายในตู้มีความสะอาด ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อโรค และช่วยป้องกันอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน

3.2 การฝึกอบรมการใช้สัตว์

- ผ่านการฝึกอบรมด้านความปลอดภัยทางชีวภาพและการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ พฤษภาคม 2564
- ผ่านการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การใช้สัตว์ทดลอง” จัดโดยศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัย มหิดล พ.ศ.2558
- ผ่านหลักสูตร “การอบรมผู้ขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์” มกราคม 2559 เลขที่ U1-01880-2558

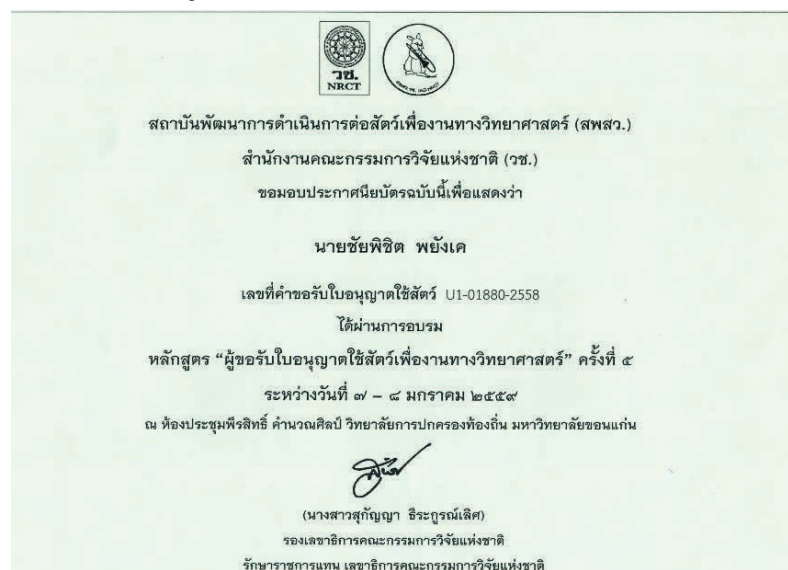
ใบรับรองการฝึกอบรมความปลอดภัยทางชีวภาพ



ใบรับรองการผ่านการฝึกอบรมการใช้สัตว์ทดลอง



การอบรมผู้ขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์



3.3 สัตว์ทดลอง

3.3.1 ข้อมูลเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง

ชนิด	อายุ	น้ำหนัก	เพศ
<i>Mus musculus</i>	6-7 weeks	16–20 g	male

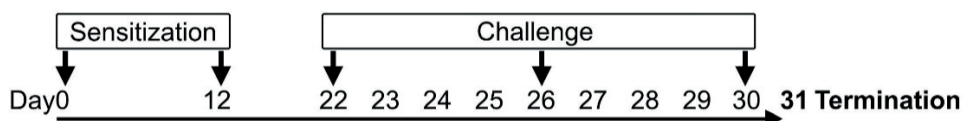
3.3.2 การดูแลสัตว์ทดลอง

หนูทดลองถูกส่งมาจากศูนย์เพาะเลี้ยงของบริษัทด้วยระบบขนส่งที่ได้มาตรฐาน มีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม อยู่ในภาชนะที่มิดชิดไม่ปนเปื้อนกับสิ่งแวดล้อมภายนอก และมีน้ำดื่มให้อย่างเพียงพอตลอดการเดินทาง หนูจะถูกส่งตรงสู่สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลองและกลับสู่กรงเลี้ยงอย่างรวดเร็วที่สุด (น้อยกว่า 3 ชั่วโมง) สัตว์จะถูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมแบบอนามัยเข้มข้น (strict hygienic conventional) ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม มีการปรับความสว่างแบบธรรมชาติ (12-hour day-night cycle) ได้รับน้ำและอาหารตามความต้องการ หนูทดลองจะถูกให้พักฟื้นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มปฏิบัติการ และจะถูกทำการุณยฆาตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3.4 วิธีการปฏิบัติงาน

การวางแผนการทดลองควรเริ่มจากการศึกษาข้อมูลทางสถิติ เพื่อกำหนดจำนวนสัตว์ทดลองและแผนการทดลองที่ชัดเจน รวมถึงการแบ่งกลุ่มการทดลองด้วย ซึ่งต้องประกอบด้วยตัวแปรควบคุมอย่างน้อยสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสัตว์ปกติ (normal control) และกลุ่มที่เกิดโรค (positive control) และกลุ่มศึกษาอื่นๆ (study groups) เช่น สัตว์ที่เป็นโรคและได้รับการรักษาแบบต่างๆ เป็นต้น ต่อไปนี้จะเป็นการแสดงวิธีการกระตุ้นหนูทดลองที่เป็นกลุ่มที่เกิดโรคเท่านั้น ซึ่งสรุปการเตรียมการได้ดังต่อไปนี้

3.4.1 แผนการทดลอง



กระบวนการทดลองทั้งหมดแสดงในแผนภาพด้านบนและจะใช้เวลาประมาณ 40 วัน นับตั้งแต่ได้รับสัตว์ทดลอง โดยสรุปคร่าวๆ คือ การทำให้หนูทดลองเกิดภูมิคุ้มกันต้านต่อ OVA ซึ่งจะฉีดเข้าทางช่องท้อง (IP) สองครั้งเพื่อให้เกิดการกระตุ้นโดยสมบูรณ์ (100%) ซึ่งปกติหนูจะมีแอนติบอดีต่อ OVA ภายใน 8–10 วัน จากนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดอาการแพ้ทางระบบหายใจโดยการสูดดมไอระเหยของ OVA โดยมีกระบวนการดังต่อไปนี้

ขั้นการกระตุ้น (sensitization)

หนูโรคหอบหืดจะได้รับสารละลายของ OVA ปริมาณ 50 μg บวกกับสารละลาย aluminum hydroxide (Alum) ปริมาตร 25 μL ซึ่งทั้งหมดละลายอยู่ในน้ำเกลือ 300 μL ผ่านทางการฉีดเข้าช่องท้อง (IP) ในวันที่ 0 และ 12

*หมายเหตุ หนูกลุ่มปกติจะได้รับการกระตุ้นด้วยน้ำเกลือเพียงอย่างเดียว

ขั้นการเหนี่ยวนำ (challenge)

หนูที่ถูกฉีดกระตุ้นแล้วจะได้รับการสูดดม สารละลาย OVA ที่ความเข้มข้น 2% ในน้ำเกลือ (normal saline solution : NSS) ปริมาตร 10 mL ด้วยวิธีพ่นละอองฝอย (nebulization) เป็นเวลา 30 นาที ในวันที่ 22, 26 และ 30

*หมายเหตุ หนูกลุ่มปกติจะได้รับการสูดดมด้วยน้ำเกลือเพียงอย่างเดียว

การให้การรักษา Treatment

การให้ยาหรือการรักษาสามารถปรับได้ในทุกช่วงของการกระตุ้น ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของแต่ละการศึกษา ควรศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมจากเอกสารหรืองานวิจัยอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง

ขั้นการเก็บข้อมูลในสัตว์ทดลอง

24 ชั่วโมงหลังจากการ challenge ครึ่งสุดท้าย หนูจะถูกทำให้สลบและเจาะหลอดลมเพื่อสอดท่อเข้าไปทำการเก็บน้ำล้างปอด (BAL fluid) จากนั้นเปิดช่องท้องเพื่อเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำใหญ่ (posterior vena cava) เก็บเนื้อปอดเพื่อนำไปวัดประเมินผลต่อไป

การวัดผล

- เซลล์ใน BAL fluid จะถูกนับจำนวนและปั่นลงบนสไลด์และย้อมด้วยสีย้อมเพื่อแยกแยะเซลล์ ภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ
- BAL fluid ที่ปั่นแยกเซลล์ออกไปแล้วจะนำไปวัดหาปริมาณ TH2 cytokines
- Serum จะนำไปวัดหาปริมาณ IgE
- เนื้อปอดจะนำไปตัด section เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเซลล์ภูมิคุ้มกัน และการเปลี่ยนแปลงของทางเดินหายใจ

การประเมินผลทางสถิติ

การประเมินผลจะเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวเนื่องกับการเกิดโรคหอบหืดในหนูแต่ละกลุ่ม เช่น จำนวนเซลล์และปริมาณของ TH2 cytokines เช่น IL-4 IL-5 และ IL-13 ใน BAL fluid จำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกัน เช่น Eosinophil Neutrophils Lymphocyte และ Monocyte ศึกษาปริมาณ serum IgE และศึกษา airway remodeling จากเนื้อเยื่อปอด การเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่าการวัดผลต่างๆ ระหว่างกลุ่มปกติและกลุ่มที่เป็นโรคจะมีนัยสำคัญก็ต่อเมื่อค่า P value ≤ 0.05 จากการคำนวณทางสถิติ

3.4.2 การเตรียมสาร

สารและคุณสมบัติ

- Ovalbumin จากบริษัท Sigma-Aldrich เป็นโปรตีนไข่ขาวบริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (antigen) เพื่อให้เกิดการต่อต้านและการแพ้ (allergy)
- Aluminum hydroxide (Alum) จากบริษัท Sigma-Aldrich ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อให้เกิดการตอบสนองที่ดีขึ้นต่อสารก่อภูมิแพ้
- Normal saline solution (NSS)

การเตรียมสารละลาย

OVA-sensitization solution:

- ชั่งโปรตีนไข่ขาว (OVA) ให้เพียงพอต่อจำนวนหนูโรคหอบหืดทั้งหมดสำหรับการกระตุ้นในหนึ่งครั้ง โดยคิดจากหนู 1 ตัว ต้องได้รับ OVA ปริมาณ 50 μ g ใส่ในหลอดที่มีฝาปิดสนิท ขนาด 15-50 mL
- ดูดน้ำเกลือสำหรับฉีด (NSS for injection) ในปริมาตรที่ใช้สำหรับปริมาณ OVA ทั้งหมด (275 μ L ต่อ OVA 50 μ g) เติมนลงในหลอด เขย่าวนเบา ๆ เพื่อให้ผสมเข้ากัน
- เพื่อให้ละลายเร็วขึ้นสามารถนำหลอดไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที
- เมื่อโปรตีนละลายหมดแล้ว เติม Alum solution ในปริมาตร 25 μ L ต่อ OVA 50 μ g ลงในหลอดสารละลาย
- ปิดฝาเกลียวให้สนิทและนำไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) แบบเอียงขึ้นลงช้าๆ ที่ความเร็ว 25 rpm
- Incubate ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาหนึ่งคืน (overnight)

หมายเหตุ ควรเตรียม sensitization solution ใหม่เสมอสำหรับการกระตุ้นแต่ละครั้ง และควรเผื่อปริมาตรของสารละลายให้เพียงพอต่อจำนวนสัตว์ทดลองและการเตรียมเข็มฉีด (320-350 μ L ต่อเข็มฉีด ต่อหนู 1 ตัว) หรือเพื่อให้มีความสะดวกในการชั่งสาร OVA

OVA-challenge solution:

- ชั่งโปรตีนไข่ขาว (OVA) น้ำหนัก 0.2 g ลงในหลอดขนาด 50 mL
- เติมน้ำเกลือ (NSS) ปริมาตร 10 mL ลงในหลอดและปิดฝาให้สนิท
- ใช้เครื่องเขย่าสารหรือปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

หมายเหตุ ควรเตรียม challenge solution ใหม่เสมอสำหรับการเหนี่ยวนำแต่ละครั้ง

BAL fluid solution:

- ใช้สารละลาย 1X PBS (phosphate buffered saline) ผสมกับ BSA (Bovine Serum Albumin) 1% ให้ได้ปริมาตรเพียงพอต่อการทำ BAL ของสัตว์ทดลองทุกตัว (ประมาณ 3 mL ต่อหนู 1 ตัว)
- เก็บในอุณหภูมิต่ำหรือวางบนน้ำแข็งตลอดเวลา

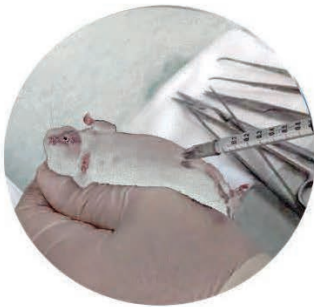
หมายเหตุ ควรเตรียมเผื่อปริมาตรเสมอ

3.4.3 การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์

เตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ให้มีความสะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธีที่เหมาะสม จะแบ่งการใช้อุปกรณ์ออกเป็นสองช่วงคือ ระหว่างการกระตุ้นโมเดลโรคหอบหืดและช่วงเก็บผลหลังสิ้นสุดการทดลอง ดังต่อไปนี้

อุปกรณ์ในการกระตุ้นและเหนี่ยวนำสัตว์ทดลอง

- OVA-sensitization solution
- OVA-challenge solution
- Sterile syringes (0.3 – 1 ml)
- Sterile needles (25-27G ยาว 0.6 mm หรือเล็กกว่า)
- Nebulizing chamber
- Nebulizer machine
- Nebulizing cartridge
- Air tube (สายท่อลม)



sensitization



nebulization

รูปที่ 1 ตัวอย่างการใช้วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคหอบหืดในหนูทดลอง

(ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

อุปกรณ์ในการผ่าตัดและเก็บผลหลังสิ้นสุดการทดลอง

- 4% paraformaldehyde solution (for lung preservation)
- 70% isopropyl alcohol
- Anesthesia agent (e.g., thiopental)
- Sterile needles (25-27G ยาว 0.6 mm หรือเล็กกว่า) สำหรับฉีดยาสลบ
- Sterile needles ขนาด 20-25 G สำหรับเก็บเลือด
- Syringes ขนาด 0.3 – 1 ml (สำหรับฉีดยา เก็บเลือด และล้างปอด)
- 20G catheter or tube (For BAL)
- ด้ายสำหรับผูกหลอดลมกับ catheter
- Surgery bed for mice (หรือ block of polystyrene foam covered with aluminum sheet)
- Tissue paper and gauze
- Needle pins
- Tubes for 3 mL of BAL fluid
- Eppendorf tubes (1.5 mL for blood and 2 mL for lung collection)
- Big surgery scissors กรรไกรใหญ่สำหรับผ่าท้องและตัดกระดูก

-

(ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

- ควรทำความเข้าใจและทบทวนคู่มือการปฏิบัติการก่อนปฏิบัติงานทุกครั้งเพื่อลดข้อผิดพลาดในการทำงาน
- ขั้นตอนการเตรียมสารกระตุ้น (sensitization solution) และเหนียวน้ำ (challenge solution) ควรทำด้วยวิธีที่ปลอดเชื้อมากที่สุดที่จะเป็นไปได้ (aseptic technique) หรือทำงานในตู้ปลอดเชื้อเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อน
- ควรศึกษาและฝึกวิธีการฉีดสารเข้าสู่ช่องท้องของหนูทดลองให้ถูกต้องเพื่อสวัสดิภาพของสัตว์ทดลอง และเพื่อลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นได้
- เพื่อลดความเจ็บปวดควรปล่อยให้สารที่จะฉีดอยู่ในอุณหภูมิห้องก่อนฉีดเข้าสู่ช่องท้องของสัตว์ทดลอง
- ก่อนเริ่มการล้างปอดและผ่าตัดหนูทดลองควรทดสอบให้แน่ใจว่าหนูทดลองได้หมดสติไปแล้วจริงๆ
- ควรใช้อุปกรณ์ที่สะอาดและมีความคมในการฉีดยาหรือผ่าตัดสัตว์ทดลอง
- เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ ควรทำให้แน่ใจว่าสัตว์ทดลองไม่มีสัญญาณชีพจริงด้วยวิธีที่เหมาะสม
- ควรเก็บสารละลายต่างๆ รวมถึงตัวอย่างจากสัตว์ทดลองไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (4°C) หรือบนน้ำแข็งตลอดเวลา

3.6 แนวคิด/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation²⁴

การศึกษาโดย T. Kung และคณะในปี 1994 ได้พัฒนาแบบจำลองหนูเพื่อศึกษาการอักเสบในปอดจากภูมิแพ้ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโรคหอบหืด ในการทดลองนี้นักวิจัยได้กระตุ้นให้หนูทดลองเกิดอาการแพ้โดยการฉีดสารสกัดจากไข่ขาว (OVA) ผสมกับอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Alum) เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนู จากนั้นหนูได้รับการกระตุ้นซ้ำด้วยการสูดดมละอองฝอยของ OVA หลังจากการฉีดครั้งแรก 12 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าภายใน 24-48 ชั่วโมงหลังการสูดดม OVA พบจำนวนอีโอซิโนฟิลซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบในโรคภูมิแพ้ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในเนื้อปอดและในน้ำยาล้างหลอดลม (BAL fluid) และพบว่าระดับอีโอซิโนฟิลในเนื้อเยื่อปอดสูงที่สุดมากกว่า 80% ที่ 24 ชั่วโมง หลังการ challenge นอกจากนี้ ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังเผยให้เห็นความเสียหายของเซลล์บุผิวทางเดินหายใจ การสร้างเมือกที่มากเกินไป และการบวมของเนื้อเยื่อปอด ซึ่งเป็นลักษณะทางพยาธิวิทยาที่เกี่ยวข้องกับโรคหอบหืด แบบจำลองนี้สามารถแสดงลักษณะการอักเสบในปอดที่เกิดจากภูมิแพ้ได้อย่างชัดเจนและสอดคล้องกับลักษณะทางพยาธิวิทยาของโรคหอบหืดในมนุษย์ (<https://doi.org/10.1159/000236807>)

T cell activation in a murine model of asthma²⁵

ในปี 1996 Krinzman และคณะ ได้ศึกษากลไกการเกิดโรคหอบหืดในหนูสายพันธุ์ BALB/c โดยกระตุ้นให้เกิดภูมิแพ้ต่ออัลบูมินจากไข่ขาว (OVA) เพื่อจำลองการเกิดโรคหอบหืดในมนุษย์ การทดลองประกอบด้วยการฉีด OVA เข้าไปในช่องท้องของหนูและให้หนูหายใจเอาละอองฝอยของ OVA เพื่อกระตุ้นการอักเสบในปอด จากนั้นได้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลาย PBS ผลการศึกษาพบว่าหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย OVA มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่สอดคล้องกับอาการโรคหอบหืด เช่น การต้านทานการไหลของอากาศเพิ่มขึ้น (airway resistance) ปริมาตรปอดลดลง และมีความไวต่อสารกระตุ้นหลอดลมเพิ่มขึ้น (hyperreactivity) รวมถึงพบการอักเสบในปอดที่มีเซลล์นิวโทรฟิลและอีโอซิโนฟิลจำนวนมาก นอกจากนี้ การวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดขาวในต่อมน้ำเหลืองในทรวงอกของหนูพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ T ชนิด CD4+ และเซลล์ B ซึ่งบ่งชี้ว่าเซลล์ T มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการอักเสบในปอดและทำให้เกิดอาการหอบหืด ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการกระตุ้นด้วย OVA ในหนูทดลองสามารถจำลองการเกิดโรคหอบหืดได้ และสนับสนุนแนวทางการรักษาโรคหอบหืดโดยการยับยั้งการทำงานของเซลล์ T เพื่อลดการอักเสบในปอด (<https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.271.3.l476>)

An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen²⁶

ปี 1998 Temelkovski และคณะ ได้พัฒนารูปแบบจำลองหนูโรคหอบหืดที่ปรับปรุงใหม่โดยใช้หนูสายพันธุ์ BALB/c ซึ่งพบว่ามีการตอบสนองต่อ IgE สูง ทำให้เหมาะสมสำหรับการศึกษาโรคหอบหืดจากภูมิแพ้ หนูทดลองได้รับการกระตุ้นให้เกิดภูมิแพ้ด้วยการฉีดสารสกัดจากไข่ขาว (OVA) ผสมกับอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เข้าช่องท้องและสูดดมละอองฝอยของ OVA 2.5% เป็นเวลา 30 นาที 3 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ การทดลองนี้ส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในทางเดินหายใจ มีการแทรกซึมของเซลล์อีโอซิโนฟิลในชั้นเยื่อผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของ

หลอดลม การเพิ่มจำนวนของ goblet cell มีการหนาตัวของเยื่อบุผิว และการเกิดพังผืดใต้เยื่อบุผิวทางเดินหายใจ นอกจากนี้ หนูยังแสดงการเพิ่มขึ้นของการหดเกร็งของหลอดลมเมื่อได้รับสารกระตุ้นเมทาโคลีน (methacholine) ซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะความไวต่อการตอบสนองของหลอดลม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ารูปแบบจำลองหนูที่พัฒนาขึ้นสามารถจำลองลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยาของโรคหอบหืดในมนุษย์ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษา กลไกการเกิดโรคและการพัฒนายาใหม่สำหรับรักษาโรคหอบหืดในอนาคต

(<https://doi.org/10.1136/thx.53.10.849>)

Molecular Characterization of Antigen-Induced Lung Inflammation in a Murine Model of Asthma²⁷

ในปี 2002 การศึกษาของ M. Daheshia และคณะ มุ่งหวังที่จะวิเคราะห์การตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ และระบุโมเลกุลเป้าหมายที่อาจใช้ในการรักษาในแบบจำลองโรคหอบหืดในหนู โดยใช้หนู BALB/c ที่ได้รับการสร้างภูมิต้านทานต่อ OVA และเหนี่ยวนำด้วยละออง OVA ในวันที่ 1, 4 และ 7 และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดที่เวลา 3 และ 18 ชั่วโมงหลังการ challenge จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ TH2, eosinophil, TH1, macrophage และเซลล์เยื่อบุผิว โดยใช้ real-time RT-PCR ผลการศึกษาพบว่าในวันแรกพบว่าการแสดงออกของ IL-4, IL-13 และยีนอื่นๆ ซึ่งอาจสะท้อนถึงการกระตุ้นของเซลล์ประจำถิ่น มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องอื่นๆ ถึง 5 เท่า ในวันที่ 7 ซึ่งสะท้อนถึงการมีส่วนร่วมของเซลล์ที่ถูกดึงเข้ามา การรักษาด้วย dexamethasone สามารถลดการแสดงออกของยีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงได้เพียงบางส่วนเท่านั้น นอกจากนี้ ยังพบว่ามีโปรตีเอส (protease) สองตัวซึ่งมีบทบาทในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย OVA ที่ยังไม่เคยมีการศึกษาในอดีต โดยผลการศึกษานี้จะถูกนำไปใช้เพื่อสร้างสมมุติฐานเกี่ยวกับโรคที่อาจมีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นพยาธิสภาพในแบบจำลองนี้ (<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb05948.x>)

Comparison of Asthma Phenotypes Using Different Sensitizing Protocols in Mice²⁸

ในปี 2005 Yoon-Seok Chang และคณะ ได้เปรียบเทียบลักษณะอาการของโรคหอบหืดในหนูทดลอง โดยใช้โปรโตคอลการทำให้เกิดการแพ้แบบต่างๆ โดยหนูทดลองได้รับการทำให้เกิดการแพ้ต่อ OVA ผ่านการฉีดเข้าช่องท้อง (IP) ด้วยโปรโตคอลที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ได้แก่ การฉีด OVA ขนาด 20 µg ใน 200 µL ของสารละลายที่มีส่วนผสมของ Alum จำนวน 2 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (กลุ่ม IPOA-2) OVA ขนาด 10 µg ใน 500 µL ของสารละลายร่วมกับ Alum จำนวน 7 ครั้งในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (กลุ่ม IPOA-7) OVA ขนาด 10 µg ใน 500 µL ของสารละลายโดยไม่ใช้ Alum จำนวน 7 ครั้งในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (กลุ่ม IPO-7) และการกระตุ้นด้วยการสัมผัสสารละลาย OVA ขนาด 1% ผ่านการสูดดมเป็นเวลา 20 นาทีต่อวันเป็นระยะเวลา 10 วัน (กลุ่ม IHO-10) หลังจากนั้น หนูทดลองทุกกลุ่มได้รับการกระตุ้นด้วยการสูดดม OVA ขนาด 1% ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน โดยมีการวัดความไวของทางเดินหายใจ (airway hyperresponsiveness: AHR), จำนวนเซลล์อักเสบในน้ำล้างหลอดลม (BAL Fluid), การศึกษาเนื้อเยื่อของปอด และระดับของ IgE และ IgG1 ที่จำเพาะต่อ OVA ในซีรัม ผลการทดลองพบว่า การฉีด OVA ร่วมกับ Alum ในกลุ่ม IPOA-2 และ IPOA-7 สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาโรคหอบหืดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะที่การฉีด OVA โดยไม่ใช้ Alum (IPO-7) นั้นไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาโรคหอบหืด และการสัมผัส OVA ผ่านการสูดดมในกลุ่ม IHO-10 ก็ไม่ทำให้เกิดความไวของทางเดินหายใจหรือการ

อักเสบในทางเดินหายใจที่มีอีโอซิโนฟิล แม้ว่าจะมีการเพิ่มขึ้นของระดับ IgG1 ที่จำเพาะต่อ OVA ก็ตาม ดังนั้น การศึกษานี้สรุปได้ว่า โปรโตคอลการฉีด OVA ร่วมกับ Alum ในกลุ่ม IPOA-2 เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการ กระตุ้นการเกิดอาการโรคหอบหืดในหนู BALB/c เนื่องจากสามารถกระตุ้นความไวของทางเดินหายใจ, อาการ อักเสบใน BAL Fluid, และการผลิต IgE และ IgG1 ที่เฉพาะต่อ OVA ได้อย่างมีนัยสำคัญ

(<https://doi.org/10.3904/kjim.2005.20.2.152>)

Eosinophils and the ovalbumin mouse model of asthma²⁹

ในปี 2014 F. Daubeuf และ N. Frossard ได้สำรวจโมเดลหนูทดลองที่มีอาการหอบหืดโดยใช้โอวาลบูมิน (OVA) เป็นสารก่อภูมิแพ้เพื่อกระตุ้นอาการอักเสบในทางเดินหายใจ เพื่อศึกษาอีโอซิโนฟิล, ความไวเกินของทางเดิน หายใจ (AHR) และการเปลี่ยนแปลงของทางเดินหายใจ (airway remodeling) โมเดลที่กล่าวถึงมีจำนวนสามแบบ ได้แก่ โมเดลคลาสสิก 21 วัน, โมเดลเร่งด่วน 8 วัน และโมเดลเรื้อรัง 57 วัน โดยแต่ละโมเดลมีลักษณะเฉพาะในแง่ ของจำนวนอีโอซิโนฟิล, AHR และการเปลี่ยนแปลงของทางเดินหายใจ ผลการทดลองพบว่าโมเดลอาการหอบหืดที่ เกิดจาก OVA นี้ทำให้เกิดการดึงดูดอีโอซิโนฟิลเข้าสู่ทางเดินหายใจอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงความไวต่อการกระตุ้น ของทางเดินหายใจ, การอักเสบ และการเปลี่ยนแปลงของทางเดินหายใจ ซึ่งทำให้โมเดลเหล่านี้มีความสำคัญต่อการ ประเมินยาที่มีศักยภาพในการรักษาอาการหืด นอกจากนี้ ผู้เขียนยังเน้นย้ำถึงข้อดีของการใช้โมเดลหนูในการวิจัยโรค หืด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเข้าถึงสัตว์ทรานส์เจนิก (transgenic animals) และเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ปฏิบัติการของเซลล์, กลไกการทำงานของปอด และการตอบสนองของทางเดินหายใจ

(https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1016-8_24)

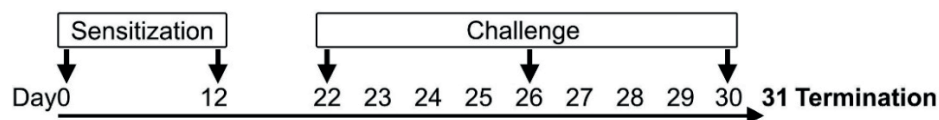
Induction of Airway Hypersensitivity to Ovalbumin and Dust Mite Allergens as Mouse Models of Allergic Asthma³⁰

ในปี 2021 การศึกษาของ Mei-Chi Chen, Jesse W Tai, และ Cheng-Jang Wu ได้พัฒนาแบบจำลองหนู เพื่อศึกษาภาวะหอบหืดจากภูมิแพ้ โดยใช้สารก่อภูมิแพ้จากโอวาลบูมิน (OVA) และสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่น (HDM) หนูถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะการตอบสนองอย่างรุนแรงและเกิดอาการหอบหืดจากภูมิแพ้ เพื่อเลียนแบบลักษณะสำคัญ ของภาวะหอบหืดในมนุษย์ ซึ่งรวมถึงการอักเสบในระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากอีโอซิโนฟิล การตอบสนองอย่างสูง ของทางเดินหายใจ (AHR) การผลิตไซโตไคน์ TH2 และการเพิ่มระดับ IgE ที่สูงขึ้นในซีรัม ผลการศึกษาพบว่า แบบจำลอง OVA และ HDM สามารถเลียนแบบลักษณะสำคัญของภาวะหอบหืดจากภูมิแพ้ในมนุษย์ได้อย่างดี โดยเฉพาะการอักเสบในทางเดินหายใจที่เกิดจากอีโอซิโนฟิล AHR การผลิตไซโตไคน์ TH2 และระดับ IgE ที่เพิ่มขึ้น

(https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1001-5_8)

4. เทคนิคในการปฏิบัติงาน

4.1 กิจกรรม/แผนการปฏิบัติงาน



4.1.1 ขั้นตอนการกระตุ้น (sensitization)

4.1.1.1 เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

4.1.1.2 เตรียมสารละลาย OVA-sensitization solution (เตรียมก่อนเริ่มปฏิบัติการ 1 วัน)

4.1.1.3 ทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (วันที่ 0 และ 12)

4.1.2 ขั้นตอนการเหนี่ยวนำ (challenge)

4.1.2.1 เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ในการเหนี่ยวนำหนูทดลอง

4.1.2.2 เตรียมสารละลาย OVA- challenge solution (เตรียมใหม่ก่อนเริ่มปฏิบัติการ)

4.1.2.3 ทำการเหนี่ยวนำหนูทดลอง (วันที่ 22, 26 และ 30)

4.1.3 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างในหนูทดลอง (termination)

4.1.3.1 เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการล้างปอด (BAL) และการผ่าตัด

4.1.3.2 เตรียมสารละลาย BAL fluid solution

4.1.3.3 ทำการเก็บตัวอย่าง (24 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำครั้งสุดท้าย)

4.1.3.3.1 ทำการล้างปอดด้วย BAL fluid solution ปริมาตร 1 mL (3 รอบ)

4.1.3.3.2 ทำการผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอย่าง ได้แก่ เลือดและเนื้อเยื่อปอด

4.2 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

4.2.1 วิธีการปฏิบัติโดยสังเขป

เริ่มจากขั้นตอนการกระตุ้น (sensitization) โดยหนูจะได้รับการฉีดสารละลายที่มีส่วนผสมของ OVA ปริมาณ 50 µg พร้อมกับสารละลายอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Alum) ปริมาตร 25 µL ซึ่งละลายอยู่ในน้ำเกลือ 300 µL ผ่านทางการฉีดเข้าช่องท้อง (IP) ในวันที่ 0 และ 12 ของการทดลอง (หนูกลุ่มควบคุมจะได้รับเพียงน้ำเกลือเท่านั้น) หลังจากนั้นในขั้นตอนการเหนี่ยวนำ (challenge) หนูที่ได้รับการกระตุ้นจะถูกทำให้สูดดมสารละลาย OVA ที่ความเข้มข้น 2% ในน้ำเกลือ ปริมาตร 10 mL ด้วยวิธีการพ่นละอองฝอยเป็นเวลา 30 นาทีในวันที่ 22, 26 และ 30 (หนูกลุ่มควบคุมจะได้รับการสูดดมละอองน้ำเกลือเพียงอย่างเดียว) หลังจากการเหนี่ยวนำครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง หนูจะถูกทำให้สลบและเจาะหลอดเลือดเพื่อเก็บน้ำล้างปอด จากนั้นจะทำการเปิดช่องท้องเพื่อเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำใหญ่ และเก็บเนื้อปอดเพื่อตรวจวัดผลต่อไป การวัดผลจะประกอบด้วย การนับเซลล์ใน BAL fluid การย้อมสีเพื่อแยกชนิดเซลล์ภูมิคุ้มกัน การวัด TH2 cytokines ใน BAL fluid การวัด IgE ในซีรัม และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของทางเดินหายใจจากชิ้นเนื้อปอด

4.2.2 ปฏิบัติการกระตุ้น (sensitization) หนูทดลองด้วยการฉีดสารละลาย OVA

4.2.2.1 เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ดูหัวข้อ 3.4.3 (การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์)

4.2.2.2 เตรียมสารละลาย OVA-sensitization solution ดังนี้

1. ก่อนเริ่มปฏิบัติการ 1 วัน ให้ทำการซังผงโปรตีน OVA และเตรียมเป็นสารละลาย OVA-sensitization solution ตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.4.2 (การเตรียมสาร)
2. ในวันทำการทดลอง นำหลอดสารละลาย OVA ออกจากเครื่องแช่ที่อุณหภูมิ 4°C และพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้สารละลายกลับสู่อุณหภูมิปกติ
3. (ทำงานด้วยวิธีปลอดเชื้อ) เปิดฝาหลอดสารละลาย OVA และใช้ sterile syringe ขนาด 1 ml ดูดสารละลาย OVA-sensitization solution ให้ได้ปริมาตร 320-350 μ L
4. ประกอบเข็มฉีดยาเข้ากับหลอดฉีดสารละลาย OVA และหมุนด้านปลายตัด (bevel) หันขึ้น โดยสามารถอ่านตัวเลขบนกระบอกฉีดยาได้สะดวก
5. นำไปใช้งานทันที หรือภายในเวลา 30-60 นาที

หมายเหตุ ควรเตรียมเข็มฉีดยาให้พร้อมสำหรับหนูทดลองทุกตัวและปรับปริมาตรก่อนฉีดให้หนูทดลอง

4.2.2.3 ทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (วันที่ 0 และ 12)

1. เขี่ยหลอดฉีดสารละลาย OVA-sensitization solution ที่เตรียมไว้เพื่อให้ตะกอนละลายไป
2. ดึงฝาเข็มออก ตั้งเข็มให้ตั้งฉาก เคาะหลอดฉีดเบาๆ เพื่อให้อากาศไปรวมอยู่ด้านบน และดันก้านฉีดขึ้นลงเพื่อไล่อากาศออกจากปลายเข็ม
3. ปรับปริมาตรเข็มฉีดยาให้ได้ระดับ 300 μ L และวางเข็มไว้สำหรับเตรียมหยิบฉีดได้สะดวก
4. ค่อย ๆ นำหนูกออกจากกรงอย่างระมัดระวังและจับหนูให้อยู่ในท่าที่เหมาะสม ดังนี้
 - ใช้มือข้างที่ไม่ถนัดจับหนังบริเวณหลังคอของหนู (scruff)
 - รวบผิวหนังด้านหลังและขยุ้มไว้ในกำมือพอกระชับแต่ไม่แน่นจนเกินไป
 - หงายมือที่จับให้หนูอยู่ในท่าที่หัวต่ำกว่าช่วงท้องเล็กน้อย (รูปที่ 3)
5. หาตำแหน่งทางกายวิภาคที่เหมาะสมสำหรับการฉีดเข้าช่องท้อง (IP) ดังนี้
 - ตำแหน่งการฉีดจะอยู่ที่บริเวณช่องท้องส่วนล่างด้านขวาของสัตว์ (เพื่อลดความเสี่ยงในการทำอันตรายกระเพาะปัสสาวะ ลำไส้ใหญ่ และอวัยวะภายในช่องท้องอื่น ๆ)
 - เข็มฉีดยาจะปักที่จุดศูนย์กลางของสามเหลี่ยมในตัวอย่งรูปที่ 3 (วงกลมสีฟ้า)
6. ถีอกระบอกฉีดด้วยมืออีกข้างเพื่อฉีดสารละลาย ดังนี้ (รูปที่ 3)
 - ชี้เข็มไปทางศีรษะของสัตว์ โดยทำมุม 30-40° องศา กับแนวระนาบ
 - หงายปลายเข็มขึ้นแล้วสอดเข็มเข้าไปที่มุมล่างขวาของช่องท้อง (วงกลมสีฟ้า)
 - ค่อยๆ สอดเข็มเข้าไปประมาณครึ่งหนึ่งของความยาวเข็ม
 - (หากสัตว์มีไขมันมากอาจจำเป็นต้องสอดเข็มเข้าไปเกือบทั้งหมดของความยาว)

7. ดึงก้านฉีดกลับเพื่อเช็คแรงดันลบ หากมีแรงต้านและไม่มีของเหลวไหลกลับให้ดำเนินการกดก้านฉีดเข้าซ้ำๆ จนกระทั่งสารละลายถูกฉีดเข้าไปจนหมด โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 วินาที
8. ดึงเข็มออกมาในแนวเส้นตรง ปิดฝาและทิ้งในภาชนะที่กำหนด
9. นำสัตว์กลับเข้าในกรงและสังเกตอาการแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้น



รูปที่ 3 ตัวอย่างการกำหนดจุดฉีดและการฉีดผ่านทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ในหนูทดลอง
(ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

หมายเหตุ

- ใช้เข็มและกระบอกฉีดยาใหม่สำหรับสัตว์แต่ละตัว
- ทำมือให้แห้งและพยายามอย่าให้เข็มเคลื่อนไหวยาวในช่องท้องของสัตว์ทดลองขณะฉีด
- หากมีเลือด ปัสสาวะ หรือของเหลวในทางเดินอาหารถูกดูดกลับเข้าในกระบอกฉีด ให้ถอดเข็มออกและทิ้งอุปกรณ์และสารทั้งหมด
- ต้องเฝ้าติดตามสัตว์อย่างใกล้ชิดเป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อตรวจหาอาการเจ็บปวด หรือการป่วย
- ถ้าสัตว์ดูปกติดีสามารถฉีดซ้ำอีกครั้งโดยเปลี่ยนมุมของเข็มเล็กน้อยตามความเหมาะสม

4.2.3 ปฏิบัติการเหนี่ยวนำ (challenge) ด้วยการให้สุดดมละอองของสารละลาย OVA

4.2.3.1 เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ในการเหนี่ยวนำหนูทดลอง

ดูหัวข้อ 3.4.3 (การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์)

4.2.3.2 เตรียมสารละลาย OVA-challenge solution ดังนี้

(เตรียมใหม่) ก่อนเริ่มปฏิบัติการให้ทำการชั่งผงโปรตีน OVA และเตรียมเป็นสารละลาย 2% OVA-challenge solution ตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.4.2 (การเตรียมสาร)

4.2.3.3 ทำการเหนี่ยวนำหนูทดลอง (วันที่ 22, 26 และ 30)

1. ทำการเช็คอุปกรณ์สำหรับการ challenge หนูทดลอง ดังนี้
 - วางเครื่อง nebulizer บนพื้นผิวที่มั่นคงเพื่อหลีกเลี่ยงการเคลื่อนที่จากแรงสั่นสะเทือน
 - เสียบปลั๊กไฟและเช็คการทำงานของเครื่อง nebulizer
 - ต่อท่อลม (air tube) เข้ากับช่องเสียบและตรวจแรงดันอากาศที่ออกจากปลายท่อลม

- ต่อปลายสายท่อลมเข้ากับ nebulizing cartridge และต่อ cartridge เข้ากับช่องอากาศเข้าของ nebulizing chamber ตรวจสอบให้แน่ใจว่าอากาศสามารถไหลเข้า chamber อย่างสะดวก
- 2. ถอดแท่งหรือกระเปาะบรรจุของเหลวของ nebulizing cartridge ออก
- 3. เทสารละลาย OVA-challenge solution ลงในกระเปาะและประกอบกลับเข้าที่
- 4. เปิดเครื่องเพื่อใช้การเกิดละอองฝอยและการไหลของละอองของสารละลายอย่างทั่วถึง
- 5. ค่อยๆ นำหนูออกจากกรงเลี้ยงอย่างระมัดระวังและหย่อนหนูลงไปใน nebulizing chamber และปิดฝาให้สนิทด้วยเทปกาว (รูปที่ 4)
- 6. เปิดเครื่องเพื่อตรวจสอบการรั่วไหลที่สำคัญและปิดรูรั่วขนาดใหญ่
- 7. ให้นำหนูทดลองสัมผัสกับละอองฝอยของสารก่อภูมิแพ้เป็นเวลา 30 นาที
- 8. เมื่อครบกำหนดเวลา ให้ปิดเครื่องและนำหนูทดลองกลับเข้ากรงเลี้ยงตามปกติ



รูปที่ 4 ตัวอย่างการเหนี่ยวนำ (challenge) ให้เกิดภาวะโรคหอบหืดผ่านทางเดินหายใจในหนูทดลอง
(ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

หมายเหตุ

- ไม่ควรปิดฝากล่อง nebulizing chamber แน่นสนิทจนเกินไปเพื่อลดแรงดันอากาศที่เกิดขึ้นภายใน
- ควรสังเกตอาการของหนูทดลองขณะสูดดมไธเรเฮยและหลังจากหยุดการทดลอง 5- 10 นาที
- หากหนูทดลองเกิดอาการผิดปกติเช่น ตกใจ กระโดดอย่างรุนแรง ช็อกหรือหยุดหายใจ ให้หยุดการทดลองและรอจนกว่าหนูกลับเป็นปกติจึงเริ่มการทดลองใหม่

4.2.4 ปฏิบัติการเก็บตัวอย่างน้ำล้างปอดและอวัยวะของหนูทดลอง (termination)

4.2.4.1 เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการล้างปอด (BAL) และการผ่าตัด

1. เตรียมอุปกรณ์ตามหัวข้อ 3.4.3 (การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์)
 - เช็ดทำความสะอาดแท่นผ่าตัดด้วยแอลกอฮอล์ และอุปกรณ์อื่นๆ ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อน
 - คลุมแท่นผ่าตัดด้วยกระดาษดูดซับที่สะอาดก่อนเริ่มการทำหัตถการใหม่ในทุกรอบ

- ทำความสะอาดเข็มหลอดและอุปกรณ์ผ่าตัดด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์ และเช็ดให้แห้งก่อนนำไปใช้งานใหม่ทุกครั้ง
2. เขียนระบุรายละเอียดบนหลอดเก็บตัวอย่างให้ชัดเจน และพร้อมต่อการใช้งาน ประกอบด้วย
 - Tube 3-15 mL (BAL fluid)
 - Eppendorf tube 1.5 mL (blood)
 - Eppendorf tube 2 mL (lung tissue)
 3. เติมสารละลาย paraformaldehyde 4% ปริมาตร 1.8 mL ลงในหลอด (2 mL tube) สำหรับเก็บเนื้อเยื่อปอด ปิดฝาให้สนิทและวางไว้ในที่ที่สะดวกต่อการหยิบใช้งาน

4.2.4.2 เตรียมสารละลาย BAL fluid solution ดังนี้

เตรียมสารละลาย PBS ที่มี BSA 1% ตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.4.2 (การเตรียมสาร) ใส่ในภาชนะที่สะดวกต่อการใช้ดูดไปใช้ด้วยกระบอกฉีดยา (syringe) วางหลอดบรรจุสารละลายไว้บนน้ำแข็งตลอดเวลา

4.2.4.3 ทำการเก็บตัวอย่าง (24 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำครั้งสุดท้าย)

4.2.4.3.1 ทำให้หนูสลบ

1. นำหนูทดลองออกจากกรงเลี้ยงและทำให้สลบด้วยการฉีดยาสลบแบบเกินขนาด (overdose)

ตัวอย่างเช่น

- Sodium thiopental
- ขนาด 100 mg/kg
- ผ่านทางช่องท้อง (IP)

2. รอจนหนูหลับและทำการเช็คหนูทดลองโดยการใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้บีบเบาๆ ที่ฝ่าเท้าของหนูทดลอง หากหนูมีการสะดุ้งแสดงว่าหนูยังไม่สลบดี ให้รอต่อไป

3. ทำการกดฝ่าเท้าของหนูอีกรอบหากไม่แสดงอาการตอบสนองให้เพิ่มแรงกดขึ้นไปอีกจนแน่ใจว่าหนูไม่ได้สติแล้วจริงๆ

หมายเหตุ ควรศึกษาวิธีการทำให้สัตว์ทดลองสลบด้วยวิธีที่เหมาะสมและอัปเดตข้อมูลใหม่ๆ อยู่เสมอ

4.2.4.3.2 ทำการล้างปอด

1. เมื่อหนูสลบดีแล้วทำการฉีดสเปรย์แอลกอฮอล์รอบๆ ตัวหนูให้ชุ่ม และวางบนกระดาษทิชชู
2. จัดให้หนูนอนหงายบนแท่นผ่าตัดโดยใช้ needle หรือเข็มหลอดตริงเท้าทั้งสี่และศีรษะไว้บนแผ่นโฟมตามภาพประกอบ (รูปที่ 5)
3. ใช้คีมคีบ (forceps) หยิบผิวหนังระหว่างคอตรงบริเวณเหนือหลอดลมและยกขึ้น
4. ใช้กรรไกรตัดผิวหนังในแนวระนาบ กว้างและยาวประมาณ 1 x 2 cm ตามแนวขวางของลำตัว เพื่อเปิดช่องคอจนเห็นชั้นกล้ามเนื้อคอที่อยู่ใต้ชั้นผิวหนัง (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การตัดผิวหนังบริเวณหลอดลมหนูทดลองเพื่อทำการเปิดหลอดลม

(ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

5. ใช้เข็มคีมในมือซ้ายและขวาคีบกล้ามเนื้อคอดึงซ้ายและขวาที่ประกบกันอยู่ แล้วค่อยดึงแยกออกจากกันในแนวระนาบซ้ายและขวาจนเผยให้เห็นหลอดลมที่พาดตามแนวยาวของลำคอชัดเจน (รูปที่ 6)

6. ใช้เข็มคีมทั้งในมือซ้ายและขวาค่อยฉีกและเนื้อเยื่อที่หุ้มหลอดลมอยู่ออกอย่างระมัดระวังจนเห็นหลอดลมสีขาวยาวประมาณ 0.5 - 1 cm (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 หลอดลมที่ปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดเรียบและหลอดลมที่เลาะเนื้อเยื่อออกแล้ว

(ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

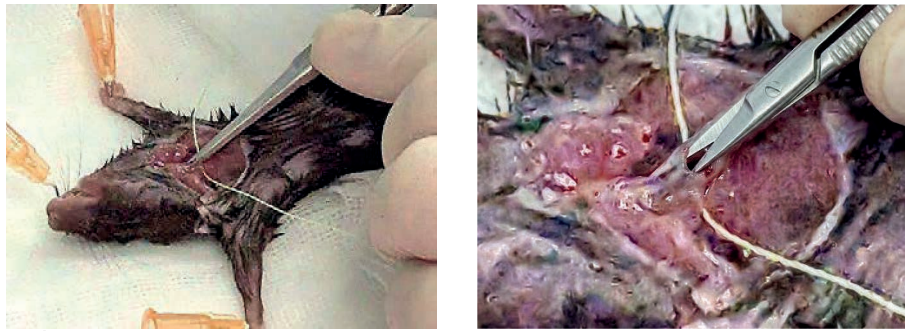


รูปที่ 7 การร้อยเส้นด้ายเข้าใต้หลอดลมเพื่อใช้ผูกท่อสวนล้างหลอดลม (ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

7. ใช้คีมแบบโค้งสอดตักเข้าไปใต้หลอดลมเพื่อคีบเอาเส้นด้ายและดึงเส้นด้ายลอดกลับมาใต้หลอดลมเพื่อเตรียมผูกกับท่อสวนล้างหลอดลมต่อไป (รูปที่ 7)

8. ทำการเจาะรูหลอดลมตามรูปตัวอย่างที่ 8 ดังนี้

- ใช้มือข้างที่ถนัดจับกรรไกรที่มีความคมสูงและใช้มืออีกข้างประคองปลายกรรไกร
- เล็งปลายกรรไกรไปที่พื้นผิวด้านบนของหลอดลมที่ระยะต่ำกว่าคอหอยเล็กน้อย เพื่อให้เหลือความยาวของหลอดลมถดลงไปจากรูที่เจาะให้มากที่สุด
- กางปากกรรไกรออกเล็กน้อยและตัดเพื่อให้เกิดรูขนาดเล็กที่พื้นผิวด้านบนของหลอดลม (รูที่เจาะมีขนาดเพียงพอที่จะให้ปลายเข็ม catheter สามารถแทรกเข้าได้โดยง่ายเท่านั้น)



รูปที่ 8 การตัดเจาะหลอดลมด้านบนให้เป็นรูด้วยการใช้กรรไกรผ่าตัด (ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

หมายเหตุ

- ควรทำงานด้วยความระวังเป็นอย่างมาก
- ควรตัดพื้นผิวหลอดลมให้ตื้นที่สุดและระวังอย่าทำให้หลอดลมขาด
- ไม่ควรใช้เข็มในการเจาะหลอดลมโดยตรงเพราะจะทำให้หลอดลมทะลุและขาดได้โดยง่าย

9. ทำการสอดท่อสวนล้าง (catheter) เข้าในหลอดลม ดังนี้

- ใช้มือทั้งสองข้างประคองเข็ม catheter ให้อยู่ด้านบนเหนือส่วนหัวของหนูทดลอง ปลายเข็มชี้ลงเข้าหาตัวผู้ปฏิบัติงานตามภาพ (รูปที่ 9)
- หมุนปลายเข็มให้หงายขึ้นและจ่อปลายเข็มไปเหนือรูที่เจาะโดยให้แนวยาวของเข็มทำมุมประมาณ 30 องศา กับแนวระนาบของความยาวของหลอดลม
- ค่อยๆ เลื่อนเข็มลงไปตามแนวเส้นตรงของความยาวของเข็ม โดยให้ปลายเข็มสอดลงในรูที่เจาะไว้ (ระวังอย่าให้ปลายเข็มทิ่มกับผนังหลอดลมด้านล่าง)



รูปที่ 9 การสอดท่อสวนล้าง catheter และการมัดหลอดลม (ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

- เมื่อส่วนปลายแหลมของเข็มสามารถเข้าไปภายในหลอดลมแล้วให้หยุดออกแรงดันและเปลี่ยนมุมของความยาวเข็มให้ขนานหรือแนบชิดกับหลอดลม (0-1 องศา)
- ออกแรงดันเข็มไปอีกครั้งจนปลายหน้าตัดของเข็มเข้าไปภายในของหลอดลมทั้งหมด
- ใช้มือข้างที่ถนัดจับฐานและท่อ catheter ส่วนนอกไว้ไม่ให้ขยับ และใช้มืออีกข้างค่อยๆ ดึงส่วนที่เป็นเข็มฉีดยาโลหะ (syringe) ออกไป
- ค่อยๆ ดันท่อสวนล้างพลาสติกเข้าไปต่อตามแนวของหลอดลมอย่างช้าๆ จนมีความลึกประมาณ 7 mm (0.7 cm) จากปลายท่อ catheter (หากมีแรงต้านให้หยุดดันทันทีและทำขั้นตอนถัดไป)
- ใช้มือทั้งสองข้างจับปลายสายเชือกทั้งสองข้างและเลื่อนตำแหน่งให้อยู่ใต้รอยตัดของหลอดลมห่างจากท่อ catheter ประมาณ 2-3 mm (0.2-0.3 cm)
- มัดหลอดลมให้แน่นกระชับกับท่อ catheter

หมายเหตุ

- ไม่ควรใช้เข็ม catheter ในการเจาะและสอดหลอดลมโดยตรง
- ขณะสอดปลายเข็มลงในรูที่เจาะระวังอย่าให้ปลายเข็มทิ่มทะลุผนังหลอดลมอีกด้าน
- ระวังอย่าดันท่อสวนล้างพลาสติกลึกเกินไปเพราะอาจทำให้ข้อปอดทะลุได้

10. ทำการล้างปอดและทางเดินหายใจ (bronchoalveolar lavage: BAL) ดังนี้

- ใช้ syringe ดูดสารละลายสำหรับล้างปอด (BAL fluid solution) ปริมาตร 1 mL
- ใช้มือข้างที่ไม่ถนัดจับฐานของท่อ catheter ไว้ให้มั่นคง (อาจใช้คีมช่วยตามภาพที่ 10) และใช้มืออีกข้างหีบกระบอกฉีดและต่อเข้ากับ catheter ให้แน่น โดยทำมุมให้ขนานกับหลอดลม



รูปที่ 10 การล้างปอดและทางเดินหายใจ (bronchoalveolar lavage: BAL)

(ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

- ใช้นิ้วที่สะดวกของมือที่ประคองกระบอกฉีดค่อยๆ ดันก้านฉีดทีละนิด (ระวังไม่ให้ท่อเคลื่อนที่)
- ดัน BAL fluid solution ปริมาตร 1 mL เข้าจนหมดในเวลาประมาณ 5 วินาที
- รอประมาณ 5-10 วินาที แล้วค่อยๆ ดูดน้ำล้างปอดกลับเข้าใน syringe จนครบปริมาตรเดิม

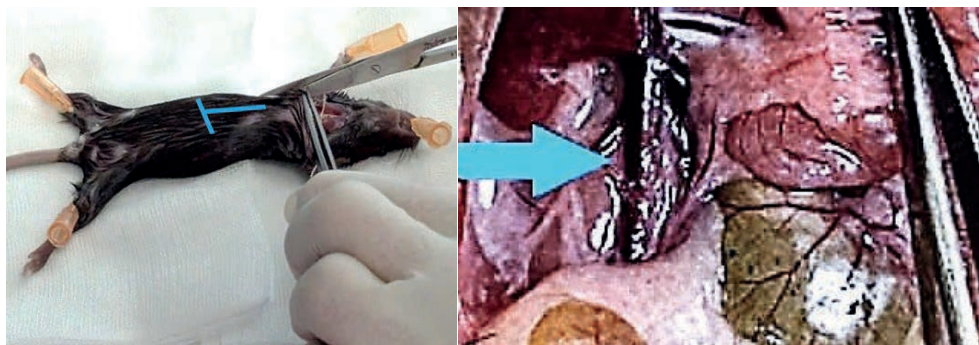
- ปลด syringe ออกและเก็บน้ำล้างปอดใส่ในหลอดที่เตรียมไว้ (วางบนน้ำแข็งตลอดเวลา)
- ทำการล้างปอดซ้ำอีก 2 รอบ จนครบ 3 รอบ (รวม 3 mL ต่อหนู 1 ตัว)
- ทำการนับเซลล์จำนวนเซลล์และปั่นเซลล์ลงบนสไลด์ภายใน 24 ชั่วโมง (ดูหัวข้อ 4.3 การประเมินและติดตามผล)
- นำน้ำล้างปอดที่เหลือปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 500g เป็นเวลา 5 นาที และแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำและเก็บไว้ที่ -80°C เพื่อรอตรวจวัดระดับไซโทไคน์ต่อไป

หมายเหตุ

- เปลี่ยน syringe ใหม่สำหรับสัตว์ทดลองแต่ละตัว
- หากไม่สามารถดึงน้ำล้างปอดกลับมาได้หมดในครั้งเดียวให้ใช้ syringe เปล่าดูดซ้ำอีกหนึ่งรอบ

4.2.4.3.3 ทำการผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอย่าง

1. ทำการเก็บเลือดหนูทดลองทางเส้นเลือดดำใหญ่ (inferior vena cava: IVC) ดังนี้
 - ทำการผ่าเปิดช่องท้องของหนู โดยใช้กรรไกรตัดผนังหน้าท้องช่วงกลางลำตัวใต้กระดูกซี่โครงเป็นเส้นตรงตามแนวยาวของลำตัวประมาณ 1-2 เซนติเมตร และแยกตัดตามแนวขวางที่ปลายสุดด้านล่างให้เป็นรูปตัว T หรือ Y กลับหัวตามรูปตัวอย่างที่ 11
 - เปิดผนังหน้าท้องแล้วใช้คีมคีบลำไส้เลื่อนไปทางด้านซ้ายของลำตัวและดันยกตับไปด้านบน
 - ค้นหาหลอดเลือดดำใหญ่ (IVC) ซึ่งอยู่ระหว่างไตทั้งสองข้าง (รูปที่ 11)
 - ใช้เข็มขนาด 25G ค่อยๆ เจาะเข้าไปในหลอดเลือดดำ ระวังการเจาะทะลุหรือฉีกขาด
 - ค่อยๆ ดึงก้านฉีดยากลับซ้ำๆ จนกว่าผนังหลอดเลือดจะยุบตัวลง
 - หยุดนิ่งชั่วคราวโดยไม่นำเข็มออกเพื่อให้เลือดเต็มเต็ม และทำซ้ำก่อนหน้าซ้ำ 3-4 ครั้ง
 - ใส่เลือดทั้งหมดลงในหลอดทดลองเปล่า (Eppendorf tube) และปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องปกติเป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วจึงนำไปวางบนน้ำแข็ง
 - ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ที่ความเร็ว 1,500g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอน
 - ใช้ไปเปิดชุด serum ส่วนที่ใสใส่ในหลอดใหม่ และเก็บไว้ที่ -80°C เพื่อรอตรวจวัดระดับ IgE ต่อไป (ดูหัวข้อ 4.3 การประเมินและติดตามผล)



รูปที่ 11 การผ่าตัดเปิดหน้าท้องหนูทดลองเพื่อหาเส้นเลือดดำใหญ่ (inferior vena cava: IVC)

(ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

หมายเหตุ

- วิธีการนี้ใช้กับการทดลองในระยะสุดท้ายเท่านั้น
- สามารถเก็บเลือดได้ประมาณ 0.4-1.0 mL ขึ้นอยู่กับขนาดของหนู
- เพื่อป้องกันหลอดเลือดยุบตัวสามารถลอกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกและใช้นิ้วกดเบาๆ เพื่อขยายหลอดเลือดก่อนทำการเจาะเส้นเลือด

2. ทำการเก็บเนื้อเยื่อปอดของหนูทดลอง ดังนี้

- ทำการผ่าเปิดช่องอกของหนูโดยใช้คีมคีบยกกระดูกหน้าอก (sternum) ขึ้นด้านบนและใช้กรรไกรตัดเลาะเนื้อเยื่อ diaphragm ที่กั้นช่องอกออก (ระวังอย่าให้โดนเนื้อปอด)
- ใช้กรรไกรใหญ่ตัดกระดูกซี่โครงด้านบนของทรวงอก จากขอบนอกสุดลึกไปจนถึงช่วงไหล่ ทั้งด้านซ้ายและขวา ตามภาพตัวอย่างที่ 12 (ระวังอย่าให้โดนเนื้อปอด)
- เปิดกระดูกหน้าอกที่ตัดขึ้นด้านบนและใช้เข็มหมุดปักไว้
- ใช้มือข้างที่ถนัดถือคีมคีบแบบปลายโค้ง และใช้มือทั้งสองคอยค้นหาขั้วปอดทั้งหมดที่อยู่ติดกับหลอดลม
- ใช้คีมคีบแบบปลายโค้งหนีบขั้วปอดซ้ายของหนูทดลองซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด และยกขึ้นช้าๆ
- ใช้กรรไกรที่มีความคมตัดขั้วปอดที่อยู่ระหว่างหลอดลมและคีมคีบให้ขาดออกจากกัน
- นำเนื้อปอดที่ได้ไปวางบนผ้าก๊อชเพื่อซับเลือดและทำความสะอาด
- นำปอดทั้งชิ้นบรรจุในหลอดสารละลายฟอรมาลินที่เตรียมไว้และเก็บบนน้ำแข็ง
- ทำการคงสภาพ (fixation: Fix) เนื้อเยื่อปอดในตู้เย็น 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- นำไปเข้าสู่กระบวนการทำสไลด์และย้อมศึกษา (ดูหัวข้อ 4.3 การประเมินและติดตามผล)



รูปที่ 12 การผ่าตัดเปิดช่องทรวงอกของหนูทดลองเพื่อเก็บเนื้อเยื่อปอด (ที่มา: ชัยพิชิต, Google pixel 7 Pro)

หมายเหตุ

- ไม่ควรเก็บชิ้นเนื้อในสารละลาย paraformaldehyde นานเกินกว่า 48 ชั่วโมง
- เนื้อเยื่อที่ผ่านการ Fix แล้ว สามารถเก็บในสารละลาย PBS ในตู้เย็นได้นาน 2 สัปดาห์
- แช่ชิ้นเนื้อที่ Fix แล้วในสารละลาย 70% ethanol ในตู้เย็นสำหรับเก็บเป็นเวลานาน

4.3 วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน

4.3.1 การวิเคราะห์น้ำล้างปอด (BAL fluid)

4.3.1.1 การนับจำนวนเซลล์อักเสบทั้งหมด (total cell count)

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการล้างปอดสัตว์ทดลองให้ทำการนับจำนวนเซลล์ในน้ำล้างปอดทันที (ไม่ต้องแยกนับเซลล์เป็นหรือเซลล์ตาย) กระบวนการคร่าวๆ คือ ใช้ไปเตตดูตุน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 μ L จากน้ำล้างปอดทั้งหมดในหลอดเก็บ (ประมาณ 3 mL) จากนั้นปล่อยลงบนสไลด์กระจกสำหรับนับเซลล์ (hemocytometer) และนำไปส่องเพื่อบันทึกเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับด้าน (inverted microscope) โดยสามารถศึกษาจากคู่มือปฏิบัติการสำหรับการนับเซลล์แบบปกติ หรือสามารถใช้วิธีการนับเซลล์อื่นๆ เช่นการใช้เครื่องมืออัตโนมัติ โดยสามารถปฏิบัติตามกระบวนการมาตรฐานการนับจำนวนเซลล์ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นค่าความหนาแน่นของเซลล์ หรือจำนวนเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร เช่น จำนวนเซลล์ในหนึ่งมิลลิลิตร (cells/mL) เป็นต้น เราสามารถคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่มีอยู่ในปอดของหนูทดลองหนึ่งตัวและนำไปเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองเพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ

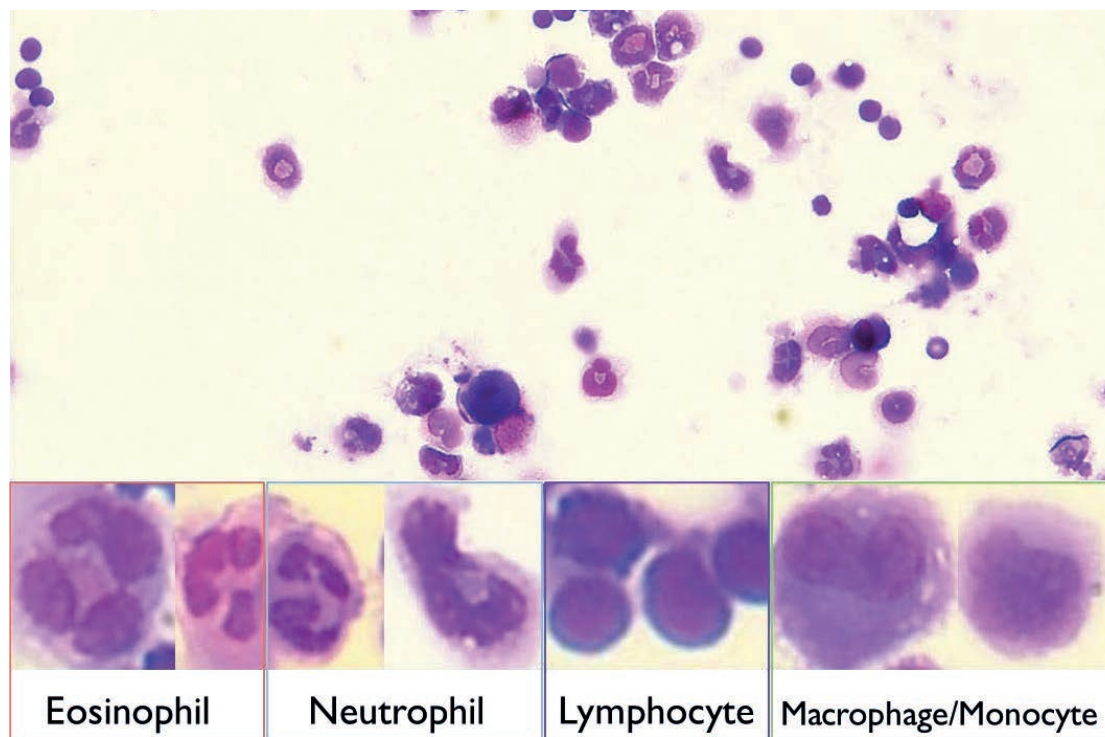
4.3.1.2 การตรวจแยกชนิดย่อยของเซลล์อักเสบ (differentiated immune cells)

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการล้างปอดให้ทำการปั่นเซลล์ในน้ำล้างปอดลงสู่แผ่นสไลด์กระจกเพื่อจะย้อมดูเซลล์ภูมิคุ้มกันแต่ละชนิด โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสไลด์ (หรือเครื่อง cytospin) โดยปฏิบัติงานตามกระบวนการมาตรฐานที่บริษัทแนะนำ มีกระบวนการคร่าวๆ คือ

- ประกอบสไลด์เข้ากับตัว adaptor
- ใช้ไปเตตดูตุน้ำล้างปอด 0.5 mL และใส่ลงในช่องเติมของเหลวของ adaptor
- นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง cytospin ด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- นำสไลด์ออกจาก adaptor และผึ่งลมให้แห้ง

หลังจากนั้นให้นำสไลด์เซลล์ที่แห้งแล้วไปย้อมสีด้วยชุดย้อมสี Dip Quick โดยปฏิบัติงานตามกระบวนการของบริษัท และนำสไลด์ที่ย้อมแล้วไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ โดยอาศัยลักษณะทางกายภาพของเซลล์เพื่อแยกแยะเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil, basophil, neutrophil และ lymphocyte ดังตัวอย่างในภาพประกอบรูปที่ 13 (ควรศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมจากแหล่งข้อมูลหรือคู่มือการจำแนกชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง) ทำการนับจำนวนเซลล์แบบสุ่มมุมมอง (field) และนับเซลล์ทุกชนิดรวมกันจนครบประมาณ 400 เซลล์ (ไม่นับเซลล์อื่นที่ปน เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง) จากนั้นจำแนกจำนวนของเซลล์แต่ละประเภทที่กล่าวมาและทำการคำนวณเพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แต่ละชนิด นำเปอร์เซ็นต์ที่ได้ไปคูณกลับกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดจากน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อประมาณ

จำนวนเซลล์แต่ละประเภทในหนุททดลองหนึ่งตัว นำไปเปรียบเทียบระหว่างหนุททดลองในแต่ละกลุ่มการทดลอง



รูปที่ 13 ตัวอย่างเซลล์จากน้ำลำปอดของหนุททดลองที่ย้อมด้วยสีย้อม Dip Quick ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ที่มา: ชัยพิชิต, Nikon Eclipse Ti-U)

4.3.1.3 การวิเคราะห์ไซโตไคน์ (cytokine analysis)

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการลำปอดและการนับจำนวนเซลล์ นำน้ำลำปอดส่วนที่เหลือไปปั่นแยกเซลล์ออกและนำไปวัดระดับไซโตไคน์ของเซลล์ TH2 ได้แก่ IL-4, IL-5, IL-13 และ IL-10 เป็นต้น โดยสามารถใช้เทคนิคได้หลากหลาย เช่น ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) หรือเทคนิค bead-based immunoassay โดยใช้ร่วมกับเครื่อง flow-cytometer ผลที่ได้จะเป็นปริมาณโปรตีนของไซโตไคน์ชนิดต่างๆ โดยรายงานเป็นความเข้มข้นต่อหน่วยปริมาตร เช่น ng/mL หรือ mg/mL นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองต่างๆ และคำนวณค่าเฉลี่ยทางสถิติของการเพิ่มขึ้นหรือลดลงในแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.3.2 การวิเคราะห์ซีรัม (serum analysis)

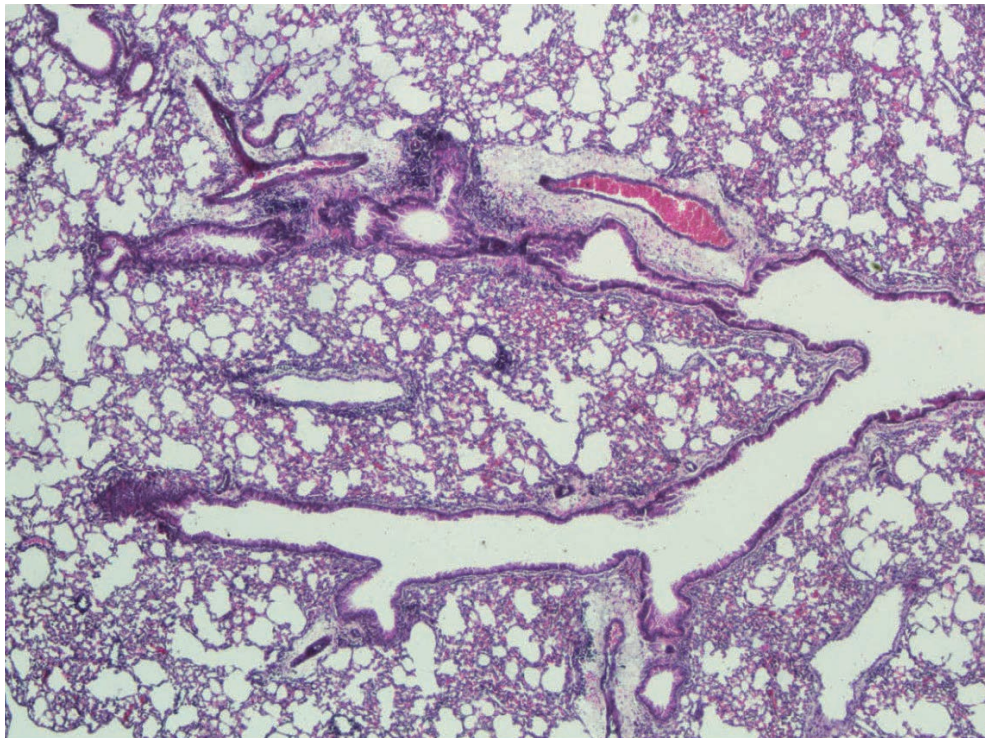
4.3.2.1 การวัดระดับ immunoglobulin E (IgE)

นำเซรัมที่เก็บไว้ที่ -80°C ออกวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอให้ละลาย หากตรวจพบว่ามีตะกอนให้ทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนใสไปทำการตรวจวัดระดับ IgE โดยใช้ชุดทดสอบ ELISA โดยปฏิบัติงานตามกระบวนการที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต สามารถใช้ชุดตรวจที่เฉพาะเจาะจงต่อโปรตีนแอนติบอดีของ OVA (OVA-specific IgE) หรือแบบรวมทั้งหมด (total IgE) ก็ได้ ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการทดลอง รายงานผลการทดลองเป็นความเข้มข้นต่อหน่วยปริมาตร เช่น ng/mL หรือ mg/mL และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองต่างๆ เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ยทางสถิติ

4.3.3 การวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อของปอด (histology)

4.3.3.1 การศึกษาการกระจายตัวของเซลล์อักเสบในปอด (pulmonary infiltration)

นำเนื้อปอดที่ผ่านการทำให้คงสภาพแล้ว (Fix) ไปผ่านกระบวนการ paraffinization เพื่อเก็บการเก็บรักษาสภาพและการทำสไลด์เนื้อเยื่อ โดยวางชิ้นเนื้อให้ระนาบแนวยาวและแนวกว้างของปอดขนานกับระนาบหน้าตัดของ block จากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome เพื่อตัดเนื้อเยื่อบริเวณกึ่งกลางของชิ้นปอดพอดิ (มุมกว้างที่สุด) ให้เป็นแผ่นบางที่มีความหนา 4 ไมโครเมตร (μm) แปะแผ่นฟิล์มที่ตัดแล้วลงบนแผ่นสไลด์กระจก จากนั้นทำการละลายแผ่นฟิล์มที่เคลือบเนื้อเยื่อออกด้วยวิธีการ deparaffinization จากนั้นทำการย้อมเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ด้วยชุดสีย้อม H&E (hematoxylin and eosin) โดยปฏิบัติงานตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ทำการประกอบขึ้นรูป (mounting) เพื่อเก็บรักษาสไลด์ด้วยสารเคลือบและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเซลล์อักเสบรอบๆ หลอดลมหรือหลอดลมที่อยู่ในเนื้อเยื่อของปอด โดยเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะถูกย้อมติดสีชมพูแดง ส่วนนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดขาวจะย้อมติดสีดำ (รูปที่ 14) ทำการถ่ายภาพทางเดินหายใจบริเวณต่างๆ นำไปเปรียบเทียบกับภาพถ่ายในลักษณะเดียวกันของหนูทดลองกลุ่มอื่นๆ เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น



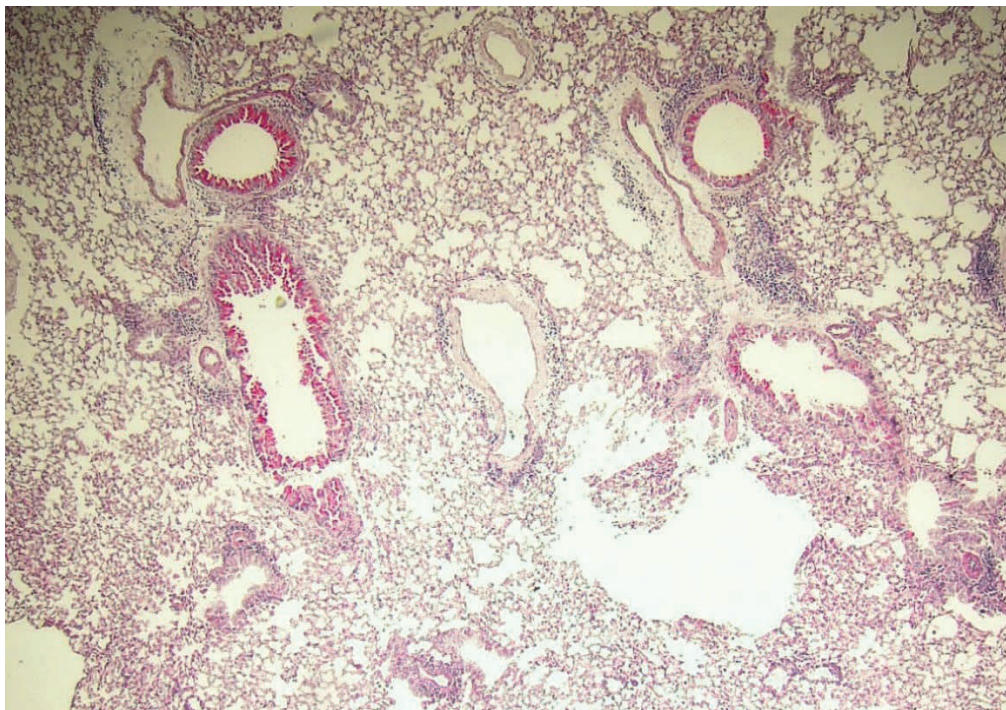
รูปที่ 14 เนื้อเยื่อปอดจากหนูทดลองที่เป็นโรคหอบหืดย้อมด้วยชุดย้อม H&E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(ที่มา: ชัยพิชิต, Nikon Eclipse Ti-U)

4.3.3.2 การศึกษาการเจริญของเซลล์เยื่อเมือกทางเดินหายใจ (goblet cell hyperplasia)

นำสไลด์ของเนื้อเยื่อปอดเหมือนในข้อก่อนหน้า (4.3.3.1) มาผ่านกระบวนการ deparaffinization จากนั้นทำการย้อมเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ด้วยชุดสีย้อม PAS (Periodic acid–Schiff) โดยปฏิบัติงานตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นทำการ mount ด้วยสารเคลือบและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์เพื่อเก็บรักษา จากนั้นนำสไลด์ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการกระจายตัวและการเจริญของ

goblet cell ซึ่งอยู่ภายในเยื่อบุของทางเดินหายใจ (mucosa) โดยเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะถูกย้อมติดสีชมพูแดง ส่วนนิวเคลียสและเซลล์เม็ดเลือดขาวจะย้อมติดสีดำ (รูปที่ 15) ทำการถ่ายภาพทางเดินหายใจบริเวณต่างๆ นำไปเปรียบเทียบกับภาพถ่ายในลักษณะเดียวกันของหนูทดลองกลุ่มอื่นๆ เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น



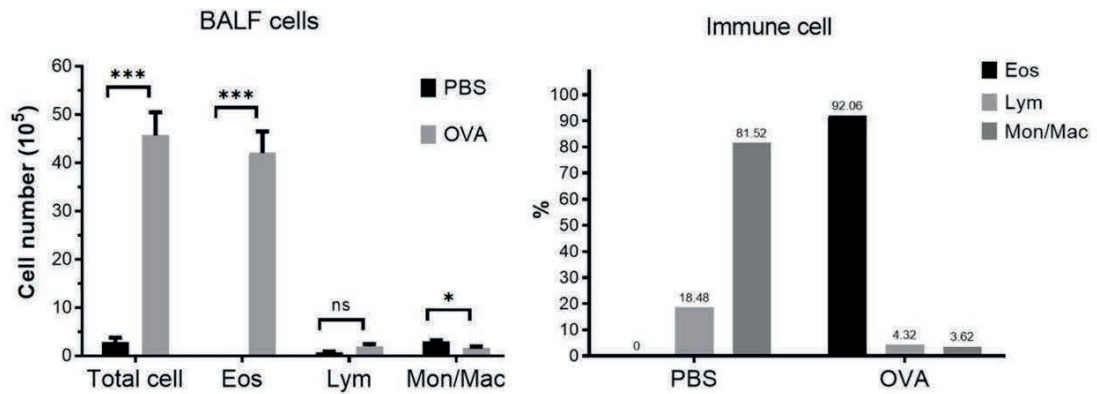
รูปที่ 15 เนื้อเยื่อปอดจากหนูทดลองที่เป็นโรคหอบหืดย้อมด้วยชุดย้อม PAS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
(ที่มา: ชัยพิชิต, Nikon Eclipse Ti-U)

4.3.4 การประเมินผลการปฏิบัติงาน (evaluation)

ผลการปฏิบัติงานจะเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวเนื่องกับการเกิดโรคหอบหืดในหนูทดลองกลุ่มที่ถูกกระตุ้น (OVA-sensitized) และกลุ่มควบคุมปกติ (NSS-sensitized) ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ทั้งหมดใน BAL fluid และจำนวนของเซลล์อักเสบ เช่น eosinophils และ lymphocytes เป็นต้น รวมถึงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ TH2 cytokines และปริมาณของ IgE ในหนูกลุ่มที่เป็นโรคหอบหืด นอกจากนั้นมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปอดเพื่อดูการอักเสบของหลอดลมและเปรียบเทียบระหว่างหนูทั้งสองกลุ่มเพื่อยืนยันว่ามีการอักเสบหรือไม่อย่างไร การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่าการวัดผลต่างๆ จะมีนัยสำคัญก็ต่อเมื่อค่า P value ≤ 0.05 จากการคำนวณทางสถิติด้วยเครื่องมือที่เหมาะสม ต่อไปนี้จะแสดงการจัดการและวิเคราะห์ข้อมูลแบบคร่าวๆ เพื่อเป็นแนวทาง ดังนี้

4.3.4.1 จำนวนเซลล์ทั้งหมดในน้ำล้างปอด (total cell count)

Fresh BAL fluid cells จะถูกนับจำนวนและคำนวณกลับเป็นจำนวนของเซลล์ทั้งหมดในน้ำล้างปอดปริมาตร 3 mL ต่อหนูทดลองหนึ่งตัว จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองและคำนวณหาค่านัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่เป็นและไม่เป็นโรคหอบหืด ดังตัวอย่างในกราฟด้านล่าง (รูปที่ 16) หนูที่เป็นโรคหอบหืดจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของเซลล์อักเสบ (inflammatory cell) ในทางเดินหายใจ



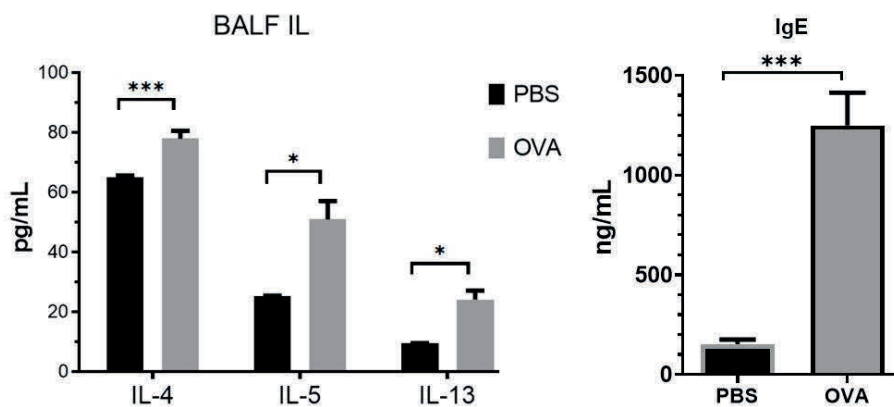
รูปที่ 16 ตัวอย่างกราฟเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ในน้ำล้างปอดระหว่างกลุ่มหนูปกติและหนูโรคหอบหืด จะเห็นว่าหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดโรคมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของเซลล์อักเสบในปอดโดยเฉพาะเซลล์ชนิด eosinophil ซึ่งเป็นตัวแปรสำคัญของอาการอักเสบของหลอดลมในโรคหอบหืดแบบเฉียบพลัน (ที่มา: Phayangke C. et al, 2024²¹)

4.3.4.2 จำนวนเซลล์อักเสบในน้ำล้างปอด (differentiated cell count)

BAL fluid cells ที่ถูกปั่นลงบนสไลด์และย้อมด้วยสีย้อมเพื่อแยกแยะเซลล์ ภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ เช่น Eosinophils, Lymphocytes, Macrophages/Monocytes จะถูกนับจำนวนและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์และนำไปคูณกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดเพื่อประมาณจำนวนของเซลล์ในน้ำล้างปอดปริมาตร 3 mL ต่อหนูทดลองหนึ่งตัว จากนั้นเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มการทดลองและคำนวณหาค่านัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่เป็นและไม่เป็นโรคหอบหืด ดังตัวอย่างในกราฟด้านบน (รูปที่ 16)

4.3.4.3 ระดับไซโตไคน์ (TH2 cytokines)

ปริมาณของโปรตีนไซโตไคน์ของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด TH2 ซึ่งได้แก่ IL-4, IL-5 และ IL-13 เป็นต้น จะถูกวัดความเข้มข้นในน้ำล้างปอดและนำไปเปรียบเทียบกับหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม หนูที่เป็นโรคหอบหืดจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของระดับ TH2 cytokines ในทางเดินหายใจ ดังตัวอย่างในกราฟด้านล่าง (รูปที่ 17)



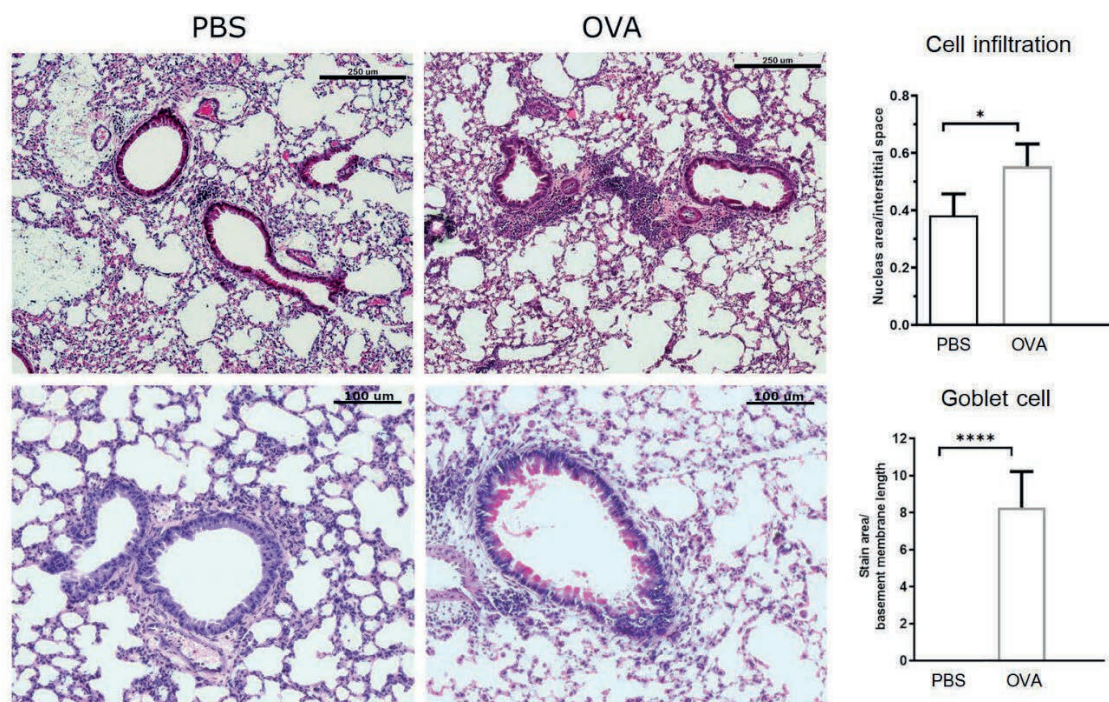
รูปที่ 17 ตัวอย่างกราฟเปรียบเทียบระดับ TH2 cytokines และ IgE ในเลือดระหว่างกลุ่มหนูปกติและหนูโรคหอบหืด หนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดโรคมีระดับ IL-4, IL-5, IL-13 และ IgE ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ (ที่มา: Phayangke C. et al, 2024; BALF IL²¹, IgE²²)

4.3.4.4 ปริมาณแอนติบอดี (IgE)

ปริมาณของโปรตีนแอนติบอดีชนิด IgE ที่อยู่ใน serum จะถูกวัดเป็นความเข้มข้นเพื่อเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม หนูที่เป็นโรคหอบหืดจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ IgE ในเลือด ดังตัวอย่างในกราฟด้านบน (รูปที่ 17)

4.3.4.5 พยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปอด (lung histology)

สไลด์เนื้อของปอดจะถูกย้อมสีและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเซลล์อักเสบและการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของทางเดินหายใจ ภาพเนื้อเยื่อจะถูกวิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ ตัวอย่างเช่น ImageJ เพื่อคำนวณหาพื้นที่ที่ย้อมติดสีของตัวชี้วัดต่างๆ และนำค่าที่ได้มาทำการประเมินความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ และนำไปเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง หนูที่เป็นโรคหอบหืดจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของเซลล์อักเสบในทางเดินหายใจและเนื้อเยื่อปอด นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของหลอดลม เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ผลิตเยื่อเมือก (goblet cell) เป็นต้น ดังตัวอย่างในกราฟด้านล่าง (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 ตัวอย่างกราฟแสดงระดับการแทรกซึมของเซลล์ภูมิคุ้มกันอักเสบในปอด และระดับการเจริญของเซลล์ผลิตเยื่อเมือกในเยื่อหลอดลม ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดโรคหอบหืดเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ (ที่มา: Phayangke C. et al, 2024²¹)

4.4 จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลองเป็นเรื่องที่ละเอียดอ่อนและต้องใช้ความระมัดระวังเป็นอย่างสูง เนื่องจากเกี่ยวข้องกับชีวิตของสัตว์ ผู้ปฏิบัติงานทุกคนต้องผ่านการอบรมและมีความรู้ความเข้าใจในหลักจริยธรรมในการใช้สัตว์ เพื่อให้มั่นใจว่าการทดลองเป็นไปอย่างถูกต้องและเป็นธรรมต่อสัตว์ ก่อนที่จะเริ่มทำการทดลอง ผู้ปฏิบัติงานต้องยื่นขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในการทดลองกับสัตว์ (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC) โดยจะต้องมีการนำเสนอรายละเอียดของการทดลอง เช่น วัตถุประสงค์ของการทดลอง ชนิดของสัตว์ จำนวนสัตว์ วิธีการทดลอง และมาตรการในการดูแลสัตว์ เพื่อให้คณะกรรมการพิจารณาว่าการทดลองนั้นเป็นไปตามหลักจริยธรรมหรือไม่ เพื่อจะหาวิธีการลดความเจ็บปวดและความเครียดของสัตว์ทดลอง ทำให้การทดลองเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและได้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือ สร้างภาพลักษณ์ที่ดีให้กับสถาบัน และเป็นไปตามมาตรฐานสากลในการทำวิจัยกับสัตว์

ผู้ปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลองต้องผ่านการอบรม

เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานมีความรู้ความเข้าใจและทักษะที่จำเป็นในการทำงานกับสัตว์ทดลอง สามารถปฏิบัติตามหลักจริยธรรมในการใช้สัตว์ได้อย่างเคร่งครัด และลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น โดยมีหลักปฏิบัติที่สำคัญ ได้แก่

1. ความรู้เกี่ยวกับสัตว์ทดลอง

ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้เกี่ยวกับชนิดของสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง ลักษณะทางกายภาพ พฤติกรรม และความต้องการทางสรีรวิทยาของสัตว์แต่ละชนิด เพื่อให้สามารถดูแลและปฏิบัติต่อสัตว์ได้อย่างเหมาะสม

2. การดูแลสัตว์

ผู้ปฏิบัติงานต้องเรียนรู้วิธีการจับ การเคลื่อนย้าย การให้อาหาร การให้น้ำ และการทำความสะอาดที่อยู่อาศัยของสัตว์อย่างถูกวิธี เพื่อให้สัตว์มีสุขภาพที่ดีและมีความเครียดน้อยที่สุด

3. การให้ยาสลบ

หากการทดลองจำเป็นต้องใช้ยาสลบ ผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับการฝึกอบรมเกี่ยวกับชนิดของยาสลบ วิธีการคำนวณปริมาณยา และวิธีการให้ยาอย่างถูกต้อง เพื่อลดความเจ็บปวดให้กับสัตว์

4. การผ่าตัด

หากการทดลองเกี่ยวข้องกับการผ่าตัด ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้เกี่ยวกับเทคนิคการผ่าตัดที่ถูกต้องและวิธีการดูแลแผลหลังการผ่าตัด เพื่อป้องกันการติดเชื้อและลดความเจ็บปวดให้กับสัตว์

5. การเก็บตัวอย่าง

ผู้ปฏิบัติงานต้องเรียนรู้วิธีการเก็บตัวอย่างทางชีวภาพ เช่น เลือด ปัสสาวะ หรือเนื้อเยื่อ จากสัตว์อย่างถูกวิธี เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีคุณภาพและไม่ทำให้สัตว์ได้รับบาดเจ็บ

6. การทำลายสัตว์

ในกรณีที่จำเป็นต้องทำลายสัตว์ ผู้ปฏิบัติงานต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ เพื่อลดความเจ็บปวดให้กับสัตว์

7. จริยธรรมในการใช้สัตว์

ผู้ปฏิบัติงานตระหนักถึงจริยธรรมในการใช้สัตว์ทดลอง และปฏิบัติตามหลักการ 3R (Replacement, Reduction, Refinement) คือ การหลีกเลี่ยง ลดจำนวน และปรับปรุงวิธีการเพื่อลดความเจ็บปวดและความเครียดของสัตว์

จรรยาบรรณในการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

1. การพิจารณาถึงความจำเป็นในการใช้สัตว์

ผู้ปฏิบัติงานต้องตระหนักถึงคุณค่าของชีวิตสัตว์ และพิจารณาอย่างรอบคอบก่อนตัดสินใจนำสัตว์มาใช้ในการทดลอง โดยต้องแน่ใจว่าการทดลองนั้นมีความจำเป็นและเป็นประโยชน์สูงสุดต่อการพัฒนาวิทยาศาสตร์และคุณภาพชีวิตของมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ ผู้ทำการทดลองต้องพยายามหาทางเลือกอื่นที่ไม่ต้องใช้สัตว์ทดลองก่อนเสมอ

2. การใช้สัตว์จำนวนน้อยที่สุด

ผู้ปฏิบัติงานต้องออกแบบการทดลองให้ใช้สัตว์จำนวนน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยคำนึงถึงสายพันธุ์และสุขภาพของสัตว์ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องและแม่นยำ

3. การใช้สัตว์ป่า

การนำสัตว์ป่ามาใช้ในการทดลองต้องกระทำเฉพาะในกรณีที่จำเป็นอย่างยิ่ง และต้องปฏิบัติตามกฎหมายและนโยบายการอนุรักษ์สัตว์ป่าอย่างเคร่งครัด

4. การดูแลสัตว์

ผู้ปฏิบัติงานต้องตระหนักว่าสัตว์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความรู้สึก จึงต้องดูแลสัตว์ด้วยความระมัดระวังตลอดกระบวนการทดลอง ตั้งแต่การขนส่ง การเลี้ยงดู การจัดสภาพแวดล้อม และการปฏิบัติการต่างๆ โดยต้องหลีกเลี่ยงการทำให้สัตว์ได้รับความเจ็บปวด ความเครียด หรือความทุกข์ทรมาน

5. การบันทึกข้อมูล

ผู้ปฏิบัติงานต้องบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการดูแลและการทดลองกับสัตว์อย่างละเอียดครบถ้วน เพื่อเป็นหลักฐานยืนยันว่าการทดลองดำเนินไปตามแผนที่วางไว้ และเพื่อให้สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้เมื่อจำเป็น

หมายเหตุ ผู้ปฏิบัติงานควรศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับกฎหมายและข้อบังคับต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้สัตว์ทดลองของประเทศไทย ออกโดยสถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.)

5. ปัญหาอุปสรรคและแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน

ขั้นตอน	ปัญหาอุปสรรค ในการปฏิบัติงาน	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
1. ไม่สามารถทำงานตาม ขั้นตอนการปฏิบัติงานได้	1. ปฏิบัติงานล่าช้า ไม่ทันเวลา	1. เพื่อให้การทดลองเป็นไปด้วยความราบรื่น และได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องแม่นยำ ก่อนเริ่ม ดำเนินการทดลอง ผู้ปฏิบัติงานควรศึกษาคู่มือ ปฏิบัติการอย่างละเอียดรอบคอบ เพื่อทำความเข้าใจขั้นตอนการทำงานทุกขั้นตอน รวมถึง วิธีการเตรียมสารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ปฏิบัติงาน 2. ผู้ปฏิบัติงานต้องมีทัศนคติที่ดีต่อการ ปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลอง รวมทั้งควรมีการ ฝึกอบรมทักษะและเทคนิคการทำงานกับ สัตว์ทดลองจนสามารถปฏิบัติงานได้อย่าง สะดวก
2. การฉีดสารเข้าทางหน้าท้อง หนูทดลอง เข็มหักหลุด หรือฉีด ไม่สำเร็จ	1. หนูทดลองตื่นทำให้การฉีดไม่ แม่นยำ หรือเกิดการบาดเจ็บต่อสัตว์ ทำให้สัตว์เกิดความเครียด 2. ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้	1. ฝึกฝนการจับสัตว์ให้ชำนาญเพื่อลดการ เคลื่อนไหวของสัตว์ขณะฉีดยา ศึกษา ตำแหน่งที่ถูกต้องสำหรับการฉีดยาให้ชัดเจน และทำเครื่องหมายบนร่างกายของสัตว์เพื่อ เป็นแนวทาง 2. เลือกใช้เข็มที่มีขนาดเหมาะสมกับสัตว์ และตรวจสอบให้แน่ใจว่าเข็มอยู่ในสภาพดี มี ความคม ไม่บิ่นหรืองอ 3. สังเกตอาการของสัตว์หลังการฉีดยาอย่าง ใกล้ชิด หากพบอาการผิดปกติให้รีบแจ้ง ผู้ดูแลหรือผู้ที่เกี่ยวข้อง 1. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าสามารถฉีดสารหรือ ยาเข้าไปในตัวสัตว์ทดลองได้อย่างสมบูรณ์ และปฏิบัติตามขั้นตอนการปฏิบัติงาน ทั้งหมดอย่างเคร่งครัด

ขั้นตอน	ปัญหาอุปสรรค ในการปฏิบัติงาน	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
	2. ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ 3. หนูเกิดการติดเชื้อ ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและผลการทดลอง	2. เตรียมสารละลายสำหรับการฉีดกระตุ้นให้ถูกต้องตามสูตร ตรวจสอบให้มั่นใจว่าสาร ovalbumin และ aluminum hydroxide ที่ใช้ต้องอยู่ในสภาพที่ใช้งานได้ ไม่หมดอายุ และย้ำว่าต้องมีการ incubate ด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาหนึ่งคืน เพื่อให้เกิดการสร้างสารประกอบที่สามารถกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันได้ 1. ตรวจสอบความสะอาดของสารที่ใช้และภาชนะบรรจุ ฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ใช้ทั้งหมด ก่อนและหลังการใช้งาน รวมถึงมือและถุงมือของผู้ปฏิบัติงาน เตรียมสารและปฏิบัติงานด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในทุกขั้นตอนด้วยความระมัดระวัง
3. การเหนี่ยวนำหนูทดลองด้วยการให้สูดดมละอองของสารละลาย OVA	1. หนูทดลองเกิดอาการตื่นตระหนกตกใจ กระโดดหรือดิ้นขณะให้สูดดมไอรระเหยในกล่องรมควัน	1. ก่อนเริ่มการรมไอรระเหยปล่อย ให้หนูทดลองทุกตัวพักในกล่อง nebulizing chamber เป็นระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้เกิดการปรับตัวและคุ้นเคย โดยอาจทดลองเปิดเครื่อง nebulizer ที่ต่อท่อลมเข้ามาในกล่อง โดยที่ไม่มีสารละลาย OVA เมื่อหนูยังอยู่ในอาการปกติจึงค่อยใส่สารละลาย OVA ใน nebulizing cartridge และจับเวลา 2. หากสังเกตว่าภายในกล่องรมไอรระเหย (nebulizing chamber) มีแรงดันมากเกินไปขณะเปิดเครื่อง nebulizer ให้ทำการดึงเทปการที่ปิดผนึกฝากล่องออกเล็กน้อยเพื่อระบายอากาศออกทางด้านบนโดยที่ไอรระเหยยังสามารถปกคลุมทุกพื้นที่ในกล่องได้อย่างทั่วถึง

ขั้นตอน	ปัญหาอุปสรรค ในการปฏิบัติงาน	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
4. การฉีดยาสลบก่อนการผ่าตัด เก็บตัวอย่าง	1. หนูทดลองไม่สลบหรือใช้เวลาอนานกว่าจะสลบ 2. หนูทดลองหลับไม่สนิท หรือยังมีการตอบสนองต่อการบีบฝาเท้า	1. ตรวจสอบการฉีดสารผ่านช่องท้องว่าถูกต้องหรือไม่ ยาเข้าไปในส่วนของอวัยวะอื่นหรือไม่ มีการไหลย้อนกลับหรือไม่ 2. ฉีดยาใหม่อีกรอบด้วยวิธีและปริมาณที่ถูกต้อง 1. ตรวจสอบคุณภาพของสารที่ใช้ วันหมดอายุ คุณภาพของการละลาย และความเข้มข้นของสารต่อน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง 2. สารบางชนิดมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ หมั่นตรวจสอบและสังเกตอาการของสัตว์ทดลอง ตลอดระยะเวลาการทำการปฏิบัติการ
5. การล้างปอดและหลอดลมของหนูทดลอง	1. มีน้ำซึมออกระหว่างการล้าง ท่อสวนล้างหลุดเนื่องจากสอดท่อตื้นเกินไป หรือมัดเชือกไม่แน่น 2. ไม่สามารถดึงน้ำล้างปอดกลับมาได้หมดในครั้งเดียว	1. สอดท่อสวนล้างเข้าไปในหลอดลมให้ลึกเท่าที่จะเป็นไปได้แต่ห้ามลึกจนทะลุขั้วปอด 2. เจาะรูหลอดลมในตำแหน่งที่สูงขึ้นไปทางด้านบนใกล้กับส่วนหัวเพื่อให้เหลือพื้นที่สอดท่อเข้าไปในหลอดลมเพิ่มขึ้น 3. มัดเชือกรอบหลอดลมด้านนอกให้แน่น กระชับกับท่อสวนล้าง อาจพันหลายรอบเพื่อป้องกันการหลุด 4. พยายามอย่าให้เกิดการเคลื่อนที่ของอุปกรณ์ที่เชื่อมต่อกัน เพื่อป้องกันการหลุดหรือหลวมขณะทำการสวนล้างหลอดลมของหนูทดลอง 1. ดันน้ำล้างปอดออกใส่ภาชนะบรรจุและให้ใช้ syringe เป่าดูดซ้ำอีกหนึ่งรอบ โดยค่อยๆ ดึงก้านฉีดกลับยาวๆ จังหวะเดียวดูดน้ำล้างปอดออกจนหมด

ขั้นตอน	ปัญหาอุปสรรค ในการปฏิบัติงาน	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
6. การเก็บเลือดจากหลอดเลือด ดำใหญ่	1. ไม่สามารถหาหลอดเลือดดำเจอ 2. มีของเหลวหรือน้ำเอ่อท่วมบริเวณ ช่องท้องของหนูทดลอง 3. น้ำเลือดน้อยหรือไม่สามารถเก็บได้ เพียงพอ	1. พยายามโกยอวัยวะภายในช่องท้องออก ให้หมดเพื่อให้เห็นผนังของช่องท้องด้านใน บริเวณส่วนหลังของหนูทดลอง 2. หากมีพังผืดหรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบดบังให้ ทำการลอกออกอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ เส้นเลือดฉีกขาด 1. ใช้ผ้าก๊อชซับของเหลวทั้งหมดออกให้แห้ง ก่อนทำการเจาะเลือด 1. ใช้นิ้วกดเบาๆ บริเวณด้านบนของหลอดเลือด เพื่อให้เกิดการขยายตัวก่อนทำการเจาะ เส้นเลือด 2. ค่อยๆ ดูดเลือดอย่างช้าๆ เมื่อหลอดเลือด ยุบตัวลงให้หยุดดูดโดยไม่ต้องขยับเข็มหรือ ดึงออก อาจใช้มือกดนวดเบาบริเวณรอบ เพื่อให้เลือดไหลมาเต็มก่อนทำการดูดต่อ
7. การเก็บเนื้อปอด	1. มีเลือดหรือเม็ดเลือดแดงปนเปื้อน ขณะเก็บเนื้อปอด	1. ตัดขั้วปอดและนำปอดทั้งชิ้นไปล้างใน น้ำเกลือ (NSS) ปลดทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้เลือด ไหลออกจากเส้นเลือดจนหมด ใช้คีมคีบ แกว่งล้างในน้ำเกลืออีกรอบ และนำไปซับ เบาๆ ด้วยผ้าก๊อชก่อนนำไปทำการ Fix ต่อไป

5.1 ข้อเสนอแนะ

1. วิธีปฏิบัติงานเพื่อจำลองโรคหอบหืดในคู่มือนี้สามารถใช้ได้กับหนูทดลองทั้งชนิด *BALB/c* และ *C57BL/6* ซึ่งขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและจุดประสงค์ของการทดลอง

2. หนูทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธีการในคู่มือนี้สามารถแสดงอาการทางสรีรวิทยาของโรคภูมิแพ้ทางระบบหายใจ เช่น การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดลม การตีบตันของทางเดินหายใจ และการลดลงของประสิทธิภาพและความจุอากาศของปอด เป็นต้น ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์การทำงานของระบบทางเดินหายใจเฉพาะของสัตว์ทดลอง (ไม่ได้กล่าวถึงการปฏิบัติงานในคู่มือเล่มนี้)

3. สามารถใช้คู่มือปฏิบัติการเล่มนี้เป็นกรณีศึกษาในการจำลองโรคหอบหืดชนิดเฉียบพลันในหนูทดลอง (mouse) และสามารถประยุกต์ใช้กับการจำลองโรคหอบหืดแบบเรื้อรังได้ โดยใช้หลักการในการเพิ่มจำนวนการกระตุ้นและเหนี่ยวนำหนูทดลองในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นเพื่อจำลองการแสดงออกของโรคเรื้อรังและพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในระบบภูมิคุ้มกันและทางเดินหายใจ

4. วิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคภูมิแพ้ในระบบทางเดินหายใจในคู่มือนี้สามารถประยุกต์ใช้กับสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ ได้ เช่น ไรฝุ่น (house dust mite), ละอองเรณู (pollen) และอื่นๆ

5. สามารถนำความรู้และหลักการจากคู่มือนี้ไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือปฏิกิริยาการตอบสนองของโรคภูมิแพ้ในระบบทางเดินหายใจของสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้

5.2 ตัวอย่างกรณีศึกษา

ตัวอย่างงานวิจัย การวิเคราะห์และการแปลผล

5.2.1 เรื่อง “ovalbumin (OVA)-induced acute and chronic asthma mouse models, the simple but complete in vivo system for airway inflammation and fibrosis study”²¹

บทนำ

โรคหอบหืดจากภูมิแพ้ (allergic asthma) เป็นโรคเรื้อรังในระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากการอักเสบซึ่งได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ถือเป็นปัญหาสุขภาพระดับโลก การทำความเข้าใจพยาธิสรีรวิทยาของโรคจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ ๆ แบบจำลองหนูทดลองที่ใช้การเหนี่ยวนำด้วย ovalbumin (OVA) สามารถเลียนแบบลักษณะสำคัญของโรคหอบหืดในมนุษย์ได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง การวิจัยนี้เปรียบเทียบแบบจำลองหนูโรคหอบหืดชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยใช้กระบวนการกระตุ้นและการท้าทายด้วย OVA ในรูปแบบที่สอดคล้องกับสถานการณ์จริง จากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์และไซโตไคน์จากน้ำล้างปอด และเก็บเนื้อเยื่อปอดเพื่อตรวจสอบการอักเสบของเซลล์ การเพิ่มจำนวน goblet cell และการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของทางเดินหายใจ (airway remodeling)

การทดลอง

งานวิจัยนี้พัฒนาแบบจำลองโรคหืดในหนูเพศผู้สายพันธุ์ C57BL/6 อายุ 6-8 สัปดาห์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็นสองรูปแบบคือ

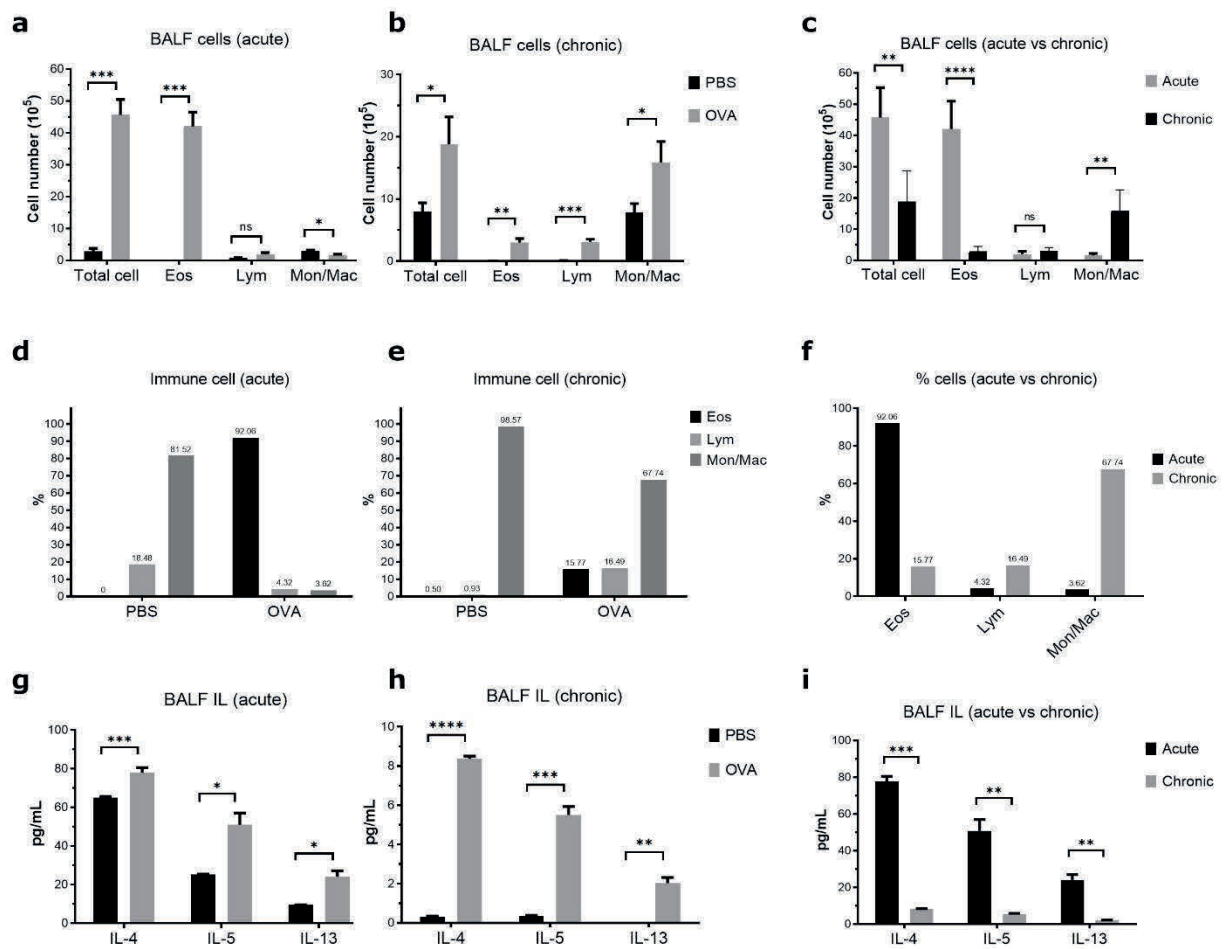
โรคหอบหืดแบบเฉียบพลัน (Acute asthma)

อ้างอิงจากโปรโตคอลของ Kunikata T et al. หนูได้รับการกระตุ้นภูมิด้วยการฉีด intraperitoneal (IP) phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 300 μ L ที่ผสม ovalbumin (OVA) 50 μ g และ alum 25 μ g ในวันที่ 0 และ 12 จากนั้นในวันที่ 22, 26 และ 30 กลุ่มที่แพ้ได้รับการเหนี่ยวนำ (challenge) ด้วยการพ่นละอองฝอย (nebulization) สารละลาย OVA 2% (w/v) PBS เป็นเวลา 30 นาที ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับการกระตุ้นและเหนี่ยวนำด้วย PBS หลังการเหนี่ยวนำครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง หนูถูกประเมินโดยเก็บตัวอย่างน้ำล้างปอด (BAL fluid) และเนื้อเยื่อปอด

โรคหอบหืดแบบเรื้อรัง (chronic asthma)

อ้างอิงจากโปรโตคอลของ Schmidt M และ Mattoli S หนูได้รับการกระตุ้นภูมิด้วยการฉีด IP ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 300 μ L ที่ผสม OVA 50 μ g และ aluminum hydroxide 25 μ g ในวันที่ 0, 8, 15 และ 22 ในช่วงการเหนี่ยวนำ(challenge) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 10 หนูได้รับการพ่นละอองฝอย OVA 2% (w/v) PBS เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 3 ครั้งต่อสัปดาห์ (วันเว้นวัน) ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับ PBS ตามลำดับเวลาเดียวกัน หนูถูกประเมน 24 ชั่วโมงหลังการทำหทัยครั้งสุดท้าย

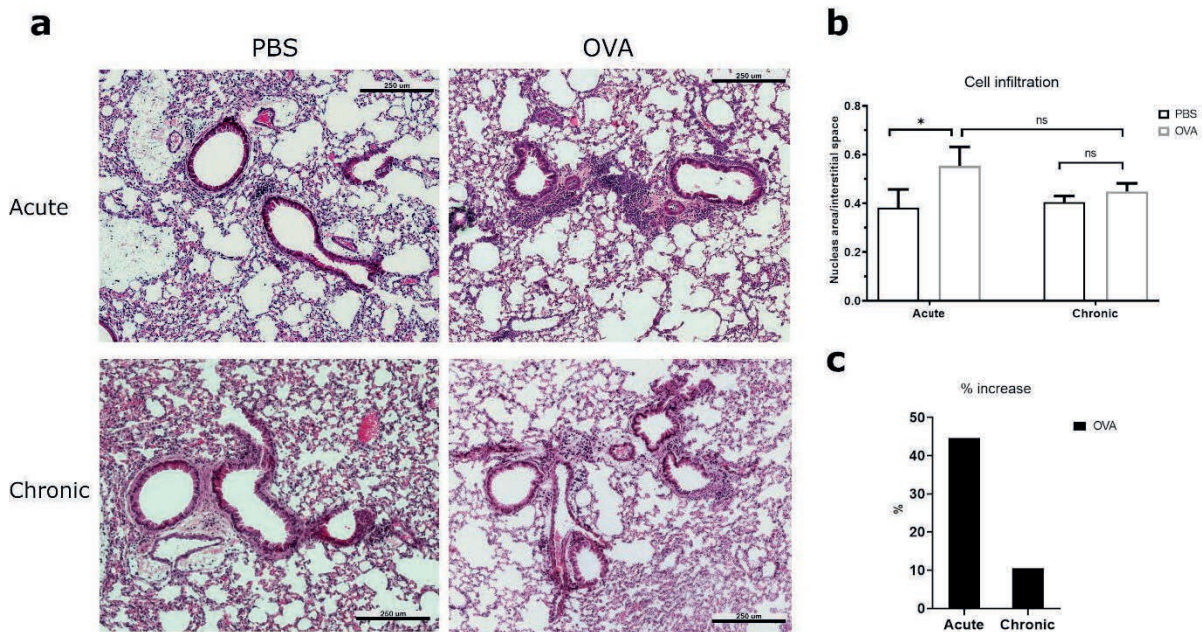
ผลการทดลอง



รูปที่ 19 การวิเคราะห์เซลล์และไซโตไคน์ในน้ำล้างปอด (BAL fluid) 24 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำครั้งสุดท้าย แสดงจำนวนเซลล์ทั้งหมด อีโอซิโนฟิล (Eos) ลิมโฟไซต์ (Lym) และโมโนไซต์/แมคโครฟาจ (Mon/Mac) ในแบบจำลองเฉียบพลัน(a) และเรื้อรัง(b) รวมถึงการเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองแบบจำลอง(c) เปอร์เซ็นต์เซลล์แต่ละประเภท(d)(e)(f) และระดับ Interleukin (IL)-4, IL-5 และ IL-13 (g)(h)(i) ผลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (n=4-6) * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001 (two-tailed paired Student's t-test) (ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) (ที่มา: Phayangke C. et al, 2024²¹)

จากรูปที่ 19 จะเห็นว่ากลุ่มควบคุมในทั้งสองแบบจำลองมี Monocytes เป็นเซลล์หลัก (>80%) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโรคหอบหืดพบว่า แบบเฉียบพลัน (acute) มีจำนวนเซลล์รวมและ Eosinophils สูงกว่าแบบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ (p <0.01 และ p <0.0001 ตามลำดับ) ในขณะที่แบบเรื้อรัง (chronic) แสดงการเพิ่มขึ้นของ Monocytes หรือ Macrophages (p <0.01) เป็นหลัก แบบจำลองทั้งสองแบบมีการเพิ่มขึ้นของ TH2

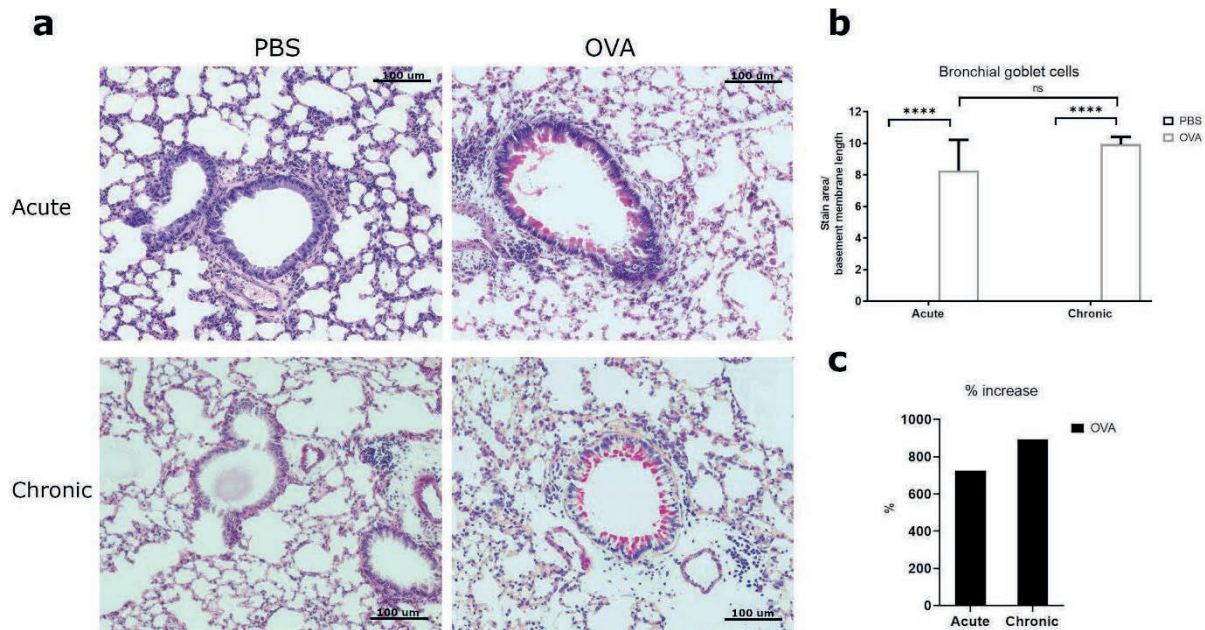
cytokines ได้แก่ IL-4, IL-5 และ IL-13 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย IL-4 สูงที่สุดในทั้งสองแบบจำลอง อย่างไรก็ตาม หนูหอบหืดแบบเฉียบพลันมีระดับ TH2 cytokines สูงกว่าแบบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ เช่น IL-4 (77.90 เทียบกับ 8.372 pg/mL, $p < 0.001$), IL-5 (50.93 เทียบกับ 5.503 pg/mL, $p < 0.01$) และ IL-13 (24.09 เทียบกับ 2.023 pg/mL, $p < 0.01$) ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าแบบจำลองโรคหอบหืดเฉียบพลันมีความรุนแรงของ airway eosinophilia และการตอบสนองของ TH2 immune ที่รุนแรงกว่าแบบเรื้อรัง



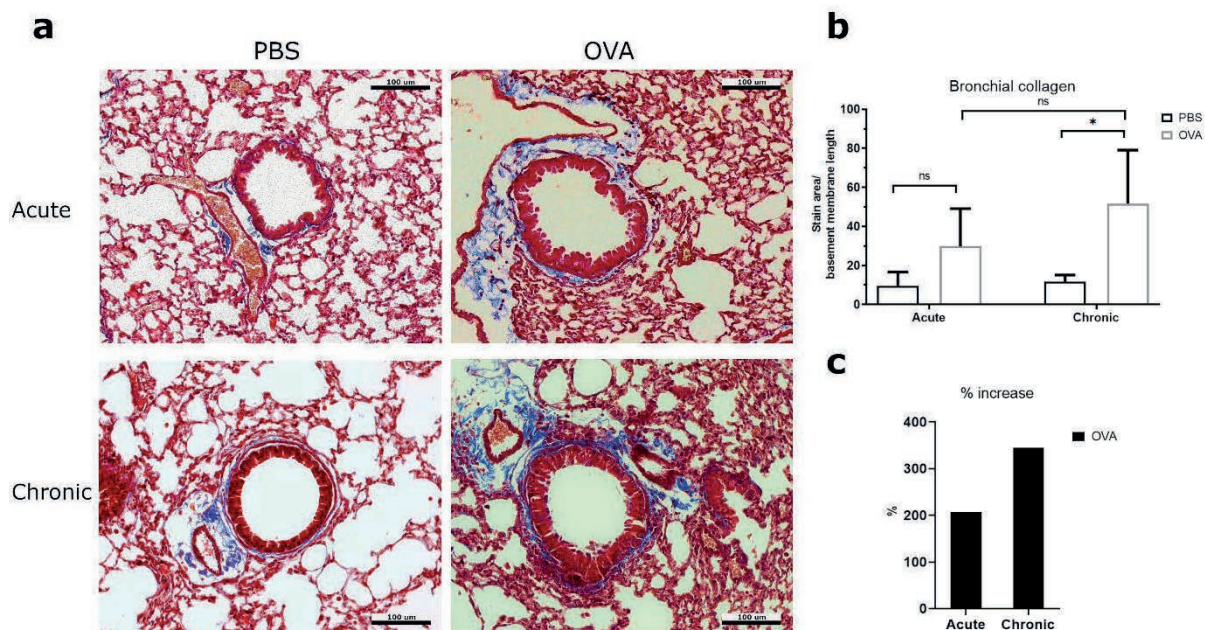
รูปที่ 20 การอักเสบของทางเดินหายใจและการแทรกซึมของเซลล์อักเสบ (a) ภาพตัวอย่างแสดงการแทรกซึมของเซลล์ในเนื้อเยื่อปอด (b) การวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ (c) เปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของการแทรกซึมของ กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM; * $p < 0.05$ (two-way ANOVA) (ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) (ที่มา: Phayange C. et al, 2024²¹)

จากรูปที่ 20 แบบจำลองโรคหืดเฉียบพลัน (acute) แสดงให้เห็นหลักฐานของการแทรกซึมของเซลล์อักเสบในเนื้อเยื่อปอด โดยแบบจำลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OVA พบว่าจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันรอบทางเดินหายใจเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ 45% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ PBS ($P < 0.05$) ในทางกลับกัน แบบจำลองโรคหืดเรื้อรัง (chronic) พบว่าการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เพียง 10% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ผลลัพธ์นี้บ่งชี้ว่าแบบจำลองโรคหืดเฉียบพลันแสดงให้เห็นหลักฐานของการแทรกซึมของเซลล์ในเนื้อเยื่อปอดได้ชัดเจนกว่าแบบจำลองโรคหืดเรื้อรัง

จากรูปที่ 21 แบบจำลองโรคหืดในหนูทั้งแบบเฉียบพลัน (acute) และแบบเรื้อรัง (chronic) มีการเพิ่มจำนวนของ goblet cell ในทางเดินหายใจอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของโรคหืด โดยจำนวน goblet cell ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคหืดด้วย OVA (ovalbumin) สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PBS อย่างมีนัยสำคัญ และมีความแตกต่างระหว่างแบบจำลองเฉียบพลันและเรื้อรัง การวิเคราะห์เชิงปริมาณพบว่า goblet cell เพิ่มขึ้นประมาณ 700% ในแบบจำลองโรคหอบหืดแบบเฉียบพลัน และ 900% ในแบบเรื้อรัง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าแบบจำลองทั้งสองสามารถจำลองภาวะ goblet cell hyperplasia ในโรคหืดได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 21 การผลิตเมือกและภาวะ goblet cells hyperplasia ในปอด (a)ภาพแสดงตัวอย่าง goblet cells (สีแดง) (b)การวิเคราะห์เมือกด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ (c)ร้อยละการเพิ่มขึ้นของการผลิตเมือก กราฟแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM **** $p < 0.0001$ (two-way ANOVA) (ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) (ที่มา: Phayangke C. et al, 2024²¹)



รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเดินหายใจและการสะสมของคอลลาเจน (a)ตัวอย่างเนื้อเยื่อคอลลาเจน (สีฟ้า) รอบหลอดเลือดและทางเดินหายใจ (b)การวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ (c)เปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนในหลอดลม กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM * $p < 0.05$ (two-way ANOVA) (ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) (ที่มา: Phayangke C. et al, 2024²¹)

จากรูปที่ 22 แบบจำลองหนูโรคหืดเรื้อรัง (chronic) พบสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทางเดินหายใจ (airways remodeling) ที่ชัดเจนกว่าแบบจำลองโรคหืดแบบเฉียบพลัน (acute) เห็นได้จากการเพิ่มของขนาดและความยาวของเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ (ciliated cells) และความหนาของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ

(smooth muscle cells) นอกจากนี้การสะสมของเนื้อเยื่อคอลลาเจน (collagen) ในแบบจำลองเรื้อรังยังพบว่ามี ความชัดเจนมากกว่าแบบจำลองเฉียบพลัน การวิเคราะห์เชิงปริมาณแสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นของคอลลาเจนใน แบบจำลองเรื้อรังเพิ่มขึ้นถึง 300% ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่แบบจำลองเฉียบพลันเพิ่มขึ้น 200% ผลลัพธ์นี้ชี้ให้เห็นว่าแบบจำลองโรคหืดเรื้อรังเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการศึกษา airway remodeling และภาวะ พังผืดในปอด (lung fibrosis)

สรุปผลการทดลอง

แบบจำลองโรคหอบหืดด้วย OVA ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังมีการแสดงออกของการอักเสบในทางเดิน หายใจด้วยการเพิ่มขึ้นของเซลล์อักเสบและไซโตไคน์ชนิด TH2 ใน BAL fluid แบบจำลองหอบหืดแบบเฉียบพลัน แสดงให้เห็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิด eosinophil ที่รุนแรงกว่า ขณะที่แบบเรื้อรังมีการเปลี่ยนแปลงของ ทางเดินหายใจที่สำคัญกว่า การพัฒนาแบบจำลองโรคหืดจากภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังผ่านการกระตุ้นด้วย OVA ช่วยให้เข้าใจกลไกทางพยาธิวิทยาที่เกี่ยวข้อง เช่น การอักเสบจากภูมิแพ้ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แบบ TH2 ภาวะอีโอซิโนฟิลเลีย การเคลื่อนย้ายของเซลล์ภูมิคุ้มกัน และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อ (tissue remodeling) แบบจำลองเหล่านี้เหมาะสำหรับการศึกษาระบาดวิทยาและการตอบสนองในระบบสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งกับโรคหืดและโรคอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากภูมิแพ้และภาวะพังผืด (fibrosis)

5.2.2 เรื่อง “Cytokine-induced killer cells: A novel treatment for allergic airway inflammation”³¹

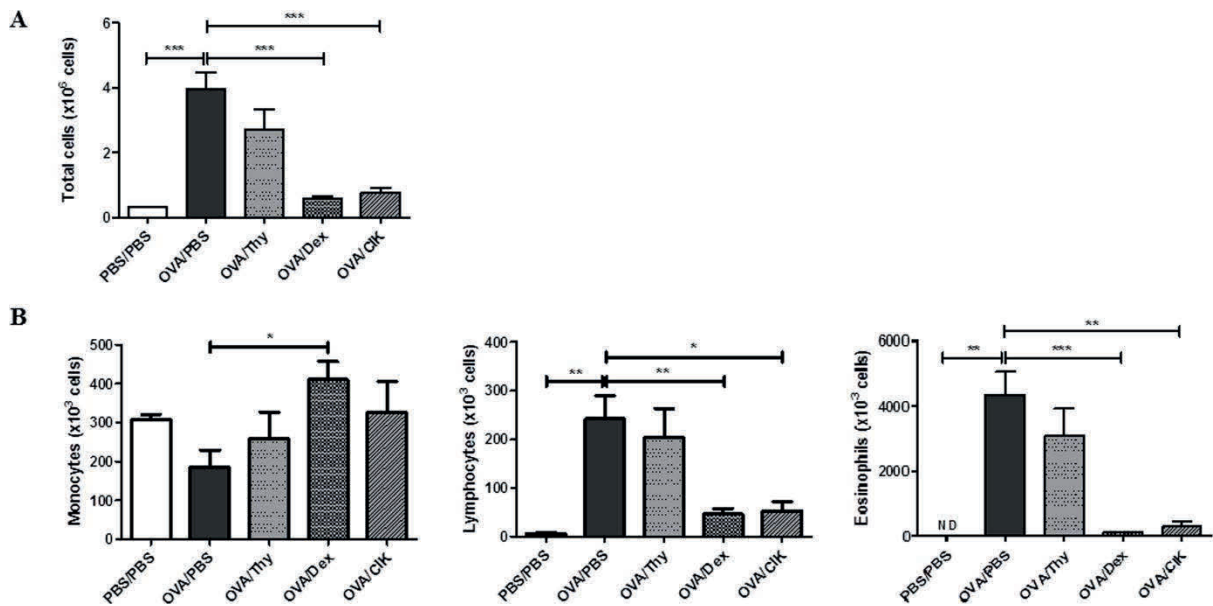
บทนำ

เซลล์ cytokine-induced killer (CIK) ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีการรักษามะเร็งมานาน ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ เพื่อรักษาการอักเสบในทางเดินหายใจจากภูมิแพ้ นักวิจัยเลี้ยงเซลล์ CIK จากเซลล์ T ของหนูในหลอดทดลอง และ ใช้กับแบบจำลองโรคภูมิแพ้ทางเดินหายใจที่กระตุ้นด้วย ovalbumin (OVA) ผลการประเมินพบว่าหนูที่ได้รับการ รักษาด้วยเซลล์ CIK มีการลดลงของตัวชี้วัดความรุนแรงของโรค เช่น จำนวนเซลล์ในน้ำล้างปอด ระดับไซโตไคน์ TH2 และลักษณะทางพยาธิวิทยาของปอด โดยไม่มีผลข้างเคียงที่ชัดเจน และผลลัพธ์ยังเปรียบเทียบกับ การรักษา ด้วยยา dexamethasone การวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพใหม่ของเซลล์ CIK ในการรักษาโรคภูมิแพ้ทางเดินหายใจ

การทดลอง

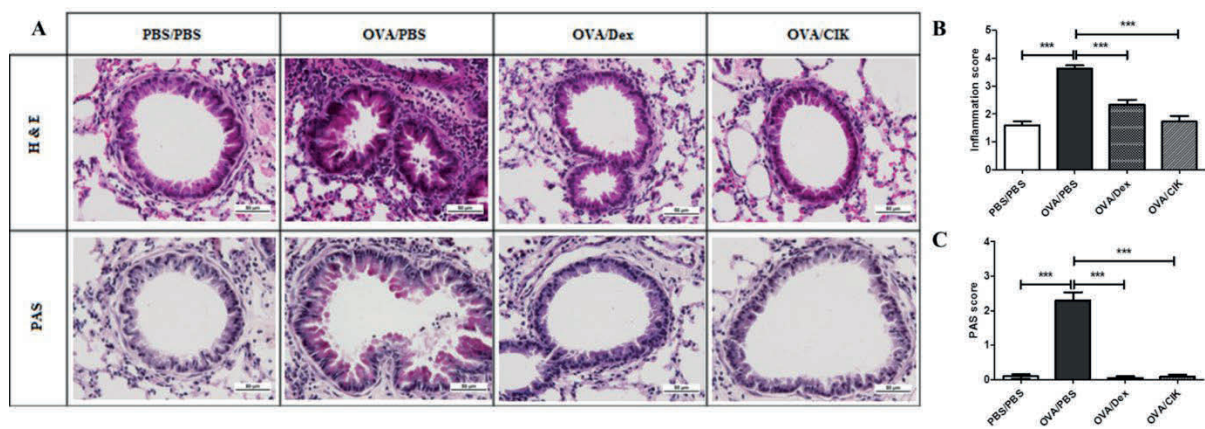
หนูเพศผู้สายพันธุ์ C57BL/6 อายุ 6-8 สัปดาห์ ได้รับการกระตุ้นด้วยการฉีดสารละลาย PBS ปริมาตร 0.3 mL ซึ่งประกอบด้วย OVA 50 μ g และ alum 25 μ g เข้าช่องท้อง (i.p.) ในวันที่ 0 และ 12 จากนั้นกลุ่มภูมิแพ้ถูก เหนี่ยวนำ (challenge) ด้วยการพ่นละอองฝอย OVA 2% (w/v) ในน้ำเกลือเป็นเวลา 30 นาทีในวันที่ 22, 26 และ 30 ขณะที่หนูกลุ่มควบคุมได้รับ PBS ทั้งในขั้นการกระตุ้นและการเหนี่ยวนำ สำหรับการรักษา หนูได้รับเซลล์ CIK จำนวน 1×10^7 เซลล์ ผ่านทางเส้นเลือดหางในวันที่ 21 และได้รับ dexamethasone ขนาด 2 mg/kg/วัน ทาง i.p. ทุกวันตั้งแต่วันที่ 21 ถึง 30 การประเมินผลดำเนินการ 24 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำครั้งสุดท้าย

ผลการทดลอง



รูปที่ 23 ความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดขาวใน BAL จำนวนเซลล์ทั้งหมด(A) และจำนวน Monocytes, Lymphocytes และ Eosinophils(B) ถูกตรวจวัดใน BAL หนูที่ถูกกระตุ้น (sensitized) และเหนี่ยวนำ (challenged) ด้วย OVA และได้รับการรักษาด้วย PBS (OVA/PBS), ไทโมไซด์ (OVA/Thy), เดกซามาทาโซน (OVA/Dex) หรือเซลล์ CIK (OVA/CIK) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (n = 8–12) จากการทดลองอิสระ 4 ชุด (ND = not detected; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$ และ ***, $P < 0.001$) (ที่มา: Pluangnooch P. et al, 2017³¹)

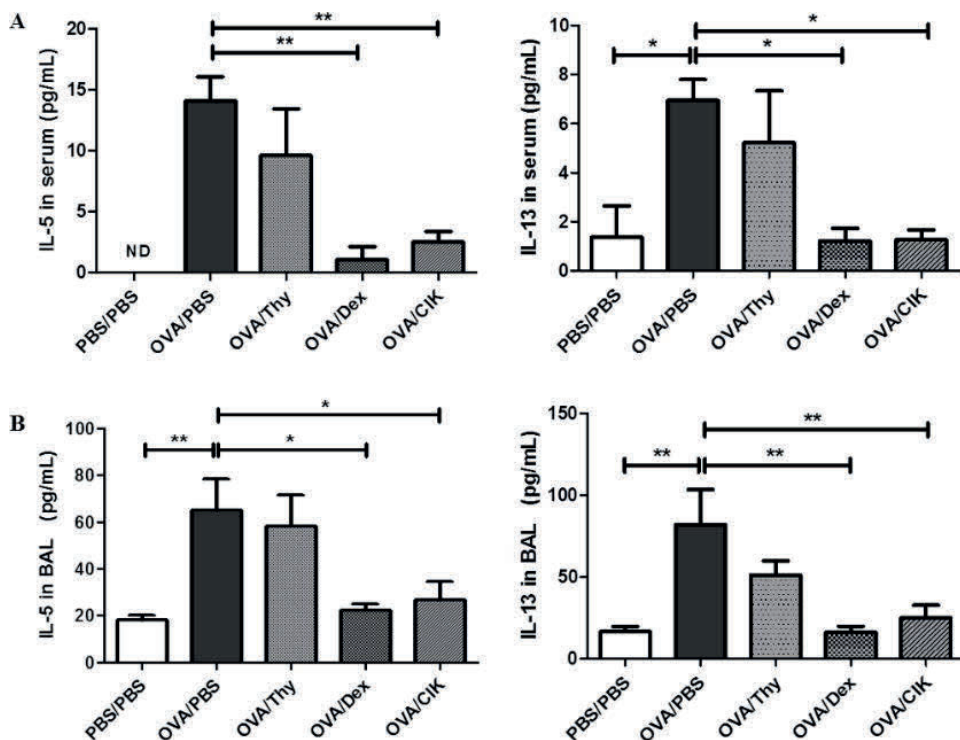
จากรูปที่ 23 หนูกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย OVA และได้รับ PBS (OVA/PBS) มีจำนวนเซลล์ใน BAL เพิ่มขึ้นถึง 15 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ (PBS/PBS) การรักษาด้วยเซลล์ thymocytes (OVA/Thy) ไม่มีผลต่อการลดความรุนแรงของการอักเสบ อย่างไรก็ตาม การรักษาด้วยเซลล์ CIK (OVA/CIK) ช่วยลดจำนวนเซลล์ทั้งหมดใน BAL ลงอย่างชัดเจนจนเทียบได้กับการรักษาด้วย dexamethasone (OVA/Dex) นอกจากนี้ สัดส่วนของอีโอซิโนฟิลใน BAL ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในกลุ่มที่ได้รับ CIK และ dexamethasone ขณะที่สัดส่วนของโมโนไซด์เพิ่มขึ้น



รูปที่ 24 ภาพของเยื่อเนื้อปอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้อมด้วยสี H&E (ด้านบน) และ PAS (ด้านล่าง) จากหนูปกติ (PBS/PBS) หนูที่มีการอักเสบทางเดินหายใจจากภูมิแพ้ที่ได้รับการรักษาด้วย PBS (OVA/PBS), เดกซามาทาโซน (OVA/Dex) หรือเซลล์ CIK (OVA/CIK)(A) กราฟแท่งแสดงคะแนนการแทรกซึมของเซลล์อักเสบ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM)(B) และเซลล์ที่ติดสี PAS (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM)(C) คะแนนได้มาจากหนู 3 ตัวต่อกลุ่ม (***, $P < 0.001$) (ที่มา: Pluangnooch P. et al, 2017³¹)

จากรูปที่ 24 ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของปอดแสดงให้เห็นว่า หนูที่ได้รับ OVA/PBS มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์อักเสบและ goblet cell ที่สร้างเมือก ขณะที่หนูที่ได้รับ OVA/CIK และ OVA/Dex แสดงการลดลงอย่างชัดเจนของทั้งการแทรกซึมของเซลล์อักเสบและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

จากรูปที่ 25 หนูกลุ่มควบคุมที่แพ้ (OVA/PBS) มีระดับ IL-5 และ IL-13 ในซีรัมและ BAL fluid สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับการรักษาด้วยเซลล์ CIK ระดับของ TH2 ไซโตไคน์เหล่านี้ลดลงอย่างชัดเจน และผลของเซลล์ CIK ยังใกล้เคียงกับการรักษาด้วยยา dexamethasone



รูปที่ 25 ระดับของไซโตไคน์ชนิด TH2 ในซีรัมและ BAL ปริมาณไซโตไคน์ชนิด TH2 (IL-5, IL-13) ในซีรัม(A) และน้ำล้างปอด (BAL)(B) ถูกวัดในกลุ่มหนูทดลองที่แตกต่างกัน ได้แก่ หนูปกติ (PBS/PBS), หนูที่ถูกกระตุ้นด้วย OVA และได้รับ PBS (OVA/PBS), หนูที่ได้รับเซลล์ไฮมาโตไคน์ (OVA/Thy), หนูที่ได้รับเดกซามะทาโซน (OVA/Dex) และหนูที่ได้รับเซลล์ CIK (OVA/CIK) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SEM) ($n = 4-8$) จากการทดลองอิสระ 4 ครั้ง (ND, not detected; *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.005$)

(ที่มา: Pluangnooch P. et al, 2017³¹)

สรุปผลการทดลอง

เซลล์ CIK สามารถลดการอักเสบของทางเดินหายใจที่มีอีโอซิโนฟิลเป็นองค์ประกอบหลักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยลดการผลิต IL-5 และ IL-13 และลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์อักเสบและ goblet cell ในปอดที่เกิดการแพ้ งานวิจัยนี้แสดงเป็นครั้งแรกว่าเซลล์ CIK สามารถใช้รักษาการอักเสบของทางเดินหายใจที่เกิดจากภูมิแพ้ในแบบจำลองหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วย OVA การรักษาด้วยเซลล์ CIK ช่วยลดการอักเสบที่มีอีโอซิโนฟิลได้ในระดับที่ใกล้เคียงกับการใช้ยาเดกซามะทาโซน อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในมนุษย์เพื่อยืนยันการนำไปใช้ในทางคลินิกในอนาคต

บรรณานุกรม

1. รูปที่ 1-12 โดยชัยพิชิต ด้วย Google pixel 7 Pro phone และรูปที่ 13-15 จากกล้อง Inverted Microscope (Nikon Eclipse Ti-U) ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
รูปที่ 16-22 มาจากงานวิจัยของผู้เขียนที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว รูปที่ 23-25 มาจากงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว และได้รับอนุญาตจากเจ้าของผลงานให้ใช้เป็นภาพประกอบของตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในคู่มือเล่มนี้
2. Kunikata T, Yamane H, Segi E, et al. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol*. 2005;6(5):524-531.
3. Schmidt M, Mattoli S. A mouse model for evaluating the contribution of fibrocytes and myofibroblasts to airway remodeling in allergic asthma. *Methods Mol Biol*. 2013; 1032:235-255.
4. Effros RM, Nagaraj H. Asthma: new developments concerning immune mechanisms, diagnosis and treatment. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2007;13(1):37-43.
5. Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9537):780-93.
6. Matsuoka T, Hirata M Fau - Tanaka H, Tanaka H Fau - Takahashi Y, Takahashi Y Fau - Murata T, Murata T Fau - Kabashima K, Kabashima K Fau - Sugimoto Y, et al. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. ((0036-8075 (Print))).
7. Klein Wolterink RG, Kleinjan A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, Levani Y et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major IL-5 and IL-13 producers in murine models of allergic asthma. *European journal of immunology*. 2012;42(5):1106-16.)
8. Bush A, Saglani S. Management of severe asthma in children. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9743):814-25.
9. O'Byrne PM, Parameswaran K. Pharmacological management of mild or moderate persistent asthma. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9537):794-803.
10. Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control of Thailand. Annual Epidemiological Surveillance Report 2020. 2020:53-6.
11. Kawamatawong T, Sangasapaviriya A, Saiphoklang N, Oer-Areemit N, Sriprasart T, Kamalaporn H et al. Guidelines for the management of asthma in adults: Evidence and recommendations. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2022;40(1):1-21.
12. Boonpiyathad T, Yimsawad S, Sangasapaviriya A. The Cost of Asthma Treatment in Phramongkutlao Hospital: Population-Based Study in Adults. *J Med Assoc Thai*. 2016;99(1):51-7.
13. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nature immunology*. 2015;16(1):45-56.
14. Chung KF. Asthma phenotyping: a necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies. *Journal of internal medicine*. 2016;279(2):192-204.

15. Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann H, Pauwels R. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(3):254-259.
16. Cho YS, Kwon B, Lee TH, et al. 4-1 BB stimulation inhibits allergen-specific immunoglobulin E production and airway hyper-reactivity but partially suppresses bronchial eosinophilic inflammation in a mouse asthma model. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(3):377-385.
17. Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res.* 2009;58(12):845-854.
18. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Therapeutic administration of Budesonide ameliorates allergen-induced airway remodelling. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(3):388-396.
19. Kunikata T, Yamane H, Segi E, et al. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol.* 2005;6(5):524-531.
20. Sagar S, Akbarshahi H, Uller L. Translational value of animal models of asthma: Challenges and promises. *European journal of pharmacology.* 2015;1:272-7.
21. Chaiphichit Phayangke, Panwadee Pluangnooch, Kitipong Soontrapa. Ovalbumin (OVA)-Induced Acute and Chronic Asthma Mouse Models, the simple but Complete In Vivo System for Airway Inflammation and Fibrosis Study, Proceedings of the 45th International Meeting of the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand. -- Bangkok: The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand, 2024, 140p, 1. Pharmacy, 1. Title, 615.1, ISBN 978-616-94260-1-1.
22. Chaiphichit Phayangkhe, Pornpimon Ek-eudomsuk, Kitipong Soontrapa. The bioflavonoid hispidulin effectively attenuates T helper type 2-driven allergic lung inflammation in the ovalbumin-induced allergic asthma mouse model, *Respiratory Investigation*, Volume 62, Issue 4, 2024, Pages 558-565, ISSN 2212-5345.
23. Pluangnooch P, Phayangkhe C, Soontrapa K. A comparison of cell-culture plasticwares for effective human cytokine-induced killer cell culture. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2023;41(4):401-406.
24. T.T. Kung, H. Jones, G.K. Adams, III, S.P. Umland, W. Kreutner, R.W. Egan, R.W. Chapman, A.S. Watnick; Characterization of a Murine Model of Allergic Pulmonary Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1 January 1994; 105 (1): 83–90.
25. Krinzman SJ, De Sanctis GT, Cernadas M, et al. T cell activation in a murine model of asthma. *Am J Physiol.* 1996;271(3 Pt 1):L476-L483. doi:10.1152/ajplung.1996.271.3. L476

26. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, et al. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax* 1998; 53:849-856.
27. DAHESHIA, M., TIAN, N., CONNOLLY, T., DRAWID, A., WU, Q., BIENVENU, J.-G., CAVALLO, J., JUPP, R., DE SANCTIS, G.T. and MINNICH, A. (2002), Molecular Characterization of Antigen-Induced Lung Inflammation in a Murine Model of Asthma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 975: 148-159.
28. Yoon-Seok Chang Y-KK, Bahn Joon-Woo, Sang-Heon Kim, Heung-Woo Park, Tae-Bum Kim, Sang-Heon Cho, Kyung-Up Min, You-Young Kim. Comparison of Asthma Phenotypes Using Different Sensitizing Protocols in Mice. *Korean J Intern Med.* 2005;20(2):152-8.
29. Daubeuf F, Frossard N. Eosinophils and the Ovalbumin Mouse Model of Asthma. In: Walsh GM, editor. *Eosinophils: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 283-93.
30. Chen M-C, Tai JW, Wu C-J. Induction of Airway Hypersensitivity to Ovalbumin and Dust Mite Allergens as Mouse Models of Allergic Asthma. In: Nagamoto-Combs K, editor. *Animal Models of Allergic Disease: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US; 2021. p. 101-14.
31. Pluangnooch P, Timalseña S, Wongkajornsilp A, Soontrapa K. Cytokine-induced killer cells: A novel treatment for allergic airway inflammation. *PLOS ONE*. 2017;12(10): e0186971.

