บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว พันธุ์วิสตาร์ (albino rat, wistar) เพศผู้ น้ำหนัก 180-200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม โดยก่อนทำการทดลองจะเลี้ยงสัตว์ทดลองไว้ประมาณ 7 วัน เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และดูแลให้ได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตลอดการวิจัย โดยดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- andrographolide

ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 3% glutaraldehyde

บริษัท คลินิคอลไดแอคโนสติคส์ ประเทศไทย

- SGOT (AST) & SGPT (ALT) sets

บริษัท แคนเบอร์รา ประเทศสหรัฐอเมริกา

- aquasol, universal LSC-coctail

บริษัท อี เมอร์ค ประเทศเยอรมนี

- diethylether
- hydrochloric chloride (HCl)
- magnesium chloride ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

บริษัท ซิกมา-เคมิคอล ประเทศสหรัฐอเมริกา

- acetaminophen
- adenosine 5′-triphosphate (ATP), dipotassium salt
- β-mercaptoethanol (2-hydroxyethylmercaptan)
- calf thymus deoxyribonucleic acid (DNA)

ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)

formic acid, ammonium salt

Hoechst 33258 dye (2-[2(4-hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl}-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazole)

phenylmethylsulfonyl fluoride

potassium chloride (KCl)

protein assay kit

sodium chloride (NaCl)

sodium hydroxide (NaOH)

sodium phosphate, monobasic monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)

sodium phosphate, dibasic anhydrous (Na_2HPO_4)

sucrose

trizma-base

บริษัท ดูปองท์ เอ็นอีเอ็น โปรดัคท์ ประเทศอังกฤษ

[^{3}H] thymidine

2.2 <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย</u>

ขวดโหลดมยาสลบ

สำลี

autopipettes และ pipet tips ขนาด 10-5,000 ไมโครลิตร (Pipetman, Gilson Medical Electronic, France)

centrifuge tubes

DEAE-cellulose discs ขนาด 200x250 มิลลิเมตร (Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)

disposable cuvettes (acrylic, polystyrene) ขนาด 1x1x3 เซนติเมตร

disposable syringe ขนาด 20 มิลลิลิตร

DSA-based liquid scintillation counters, model Wallac 1409 (Wallac OY, Finland)

Heidolph glass homogeniser type 50203 RZR 2

heparinzed capillary tubes

ice bath

labolatory centrifuge, model H-103N (Kokusan Enshinki, Japan)

microcentrifuge tubes

needles 20 gauge

scintillation vials ขนาด 7 มิลลิลิตร

shaker bath (Hetofrig, Danmark)

spectrofluorometer, model FP-777 (Japan Spectroscopic Co., Ltd.)

spectrophotometer (Ultraspec II, LKB biochromw Ltd., England)

ultracentrifuge และ rotor type 90 Ti (Beckman Instruments, Inc., U.S.A.)

vortex mixer (Clay Adams, U.S.A.)

water bath (Heto Lab Equibment, Danmark)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 <u>การศึกษาหาขนาดของอะเซตามิโนเฟนที่ให้ทางปากหนูขาว แล้วทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับ</u>

เป็นการศึกษาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของอะเซตามิโนเฟนในการทำให้เกิดพิษต่อตับในหนูขาว โดยปรับปรุงวิธีการวิจัยมาจาก Zieve และคณะ (1985)

3.1.1 เตรียมสารแขวนตะกอนอะเซตามิโนเฟน โดยการนำอะเซตามิโนเฟนมาแขวนตะกอนใน 60% (w/v) sucrose ให้ได้ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.2 วิธีการทดลอง ใช้สัตว์ทดลองทั้งหมดจำนวน 24 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆละ 8 ตัว

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมไม่ให้ intervention ใดๆ

กลุ่มที่ 2 ให้อะเซตามิโนเฟนขนาด 1,200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก

กลุ่มที่ 3 ให้อะเซตามิโนเฟนขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก

จากนั้นทำการทดลองโดยปฏิบัติดังนี้

1. เจาะเลือดสัตว์ทดลองทุกกลุ่มที่เวลาเริ่มต้น T_0 (ก่อนการให้ intervention)
2. ป้อนอะเซตามิโนเฟนขนาดต่างๆตามน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2 และ 3
3. ให้อาหารและน้ำสัตว์ทดลองทุกกลุ่มตามปกติ
4. เจาะเลือดสัตว์ทดลองทุกกลุ่มที่เวลา T_1 และ T_2 (12 และ 24 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน ตามลำดับ)
5. นำเลือดที่ได้ไป centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 15 นาที เพื่อแยกซีรั่มนำไปวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ transaminase (SGOT และ SGPT)

3.2 <u>การศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการทดแทนเซลล์เก่าของตับในหนูขาวภายหลังการทำลายเซลล์ตับจากอะเซตามิโนเฟน</u>

ปรับปรุงวิธีการวิจัยมาจาก Tsukamoto และ Kojo (1992)

3.1.1 เตรียมสารแขวนตะกอนแอนโดรกราโฟไลด์ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการบดแอนโดรกราโฟไลด์ให้ละเอียด นำไปแขวนตะกอนใน 60% (w/v) sucrose ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.2 วิธีการทดลอง ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 192 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มๆละ 48 ตัว โดยแบ่งทำการทดลองในแต่ละครั้งทั้ง 4 กลุ่มๆละ 4 ตัว

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมไม่ให้ intervention ใดๆ

กลุ่มที่ 2 ให้อะเซตามิโนเฟนขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก

กลุ่มที่ 3 ให้แอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้งทางปาก

กลุ่มที่ 4 ให้อะเซตามิโนเฟนขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก ก่อนให้แอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อนำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

จากนั้นทำการทดลองโดยปฏิบัติดังนี้

ก. ศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการทดแทนเซลล์เก่าของตับภายหลังการทำลายเซลล์ตับจากอะเซตามิโนเฟน

1. เจาะเลือดสัตว์ทดลองทุกกลุ่มที่เวลาเริ่มต้น T_0 (ก่อนการให้ intervention)
2. ป้อนอะเซตามิโนเฟนขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก แก่สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4
3. เจาะเลือดสัตว์ทดลองทุกกลุ่มที่เวลา T_1 (12 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)
4. ป้อนแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก แก่สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4
5. จากนั้นนำสัตว์ทดลองมาดมสลบด้วย diethylether แล้วทำการผ่าหน้าท้อง ใช้ 0.9% (w/v) NaCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตรล้างเลือดภายในตับทาง portal vein แล้วทำการตัดตับออกมาแบ่งเป็น 2 ส่วน โดย

ส่วนที่ 1 นำไปใส่ในขวดน้ำยา 3% glutaraldehyde ที่เตรียมไว้ เพื่อส่งตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (histopathology) โดยใช้ Transmission electron microscope (TEM)

ส่วนที่ 2 นำไปบดให้ละเอียดด้วย homogeniser ให้ได้ 20% (w/v) rat liver homogenate โดยบดตับสัตว์ทดลอง 2 กรัมโดยประมาณ ในสารละลาย tris-HCl buffer, pH 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย 50 mM tris-HCl, 0.25 M sucrose, 10 mM β-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM EDTA) จากนั้นแบ่ง rat liver homogenate ออกเป็น 2 ส่วน เพื่อนำไปตรวจหาปริมาณ DNA ในตับ และวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ thymidine kinase

ข. ศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการทดแทนเซลล์เก่าของตับภายหลังการทำลายเซลล์ตับจากอะเซตามิโนเฟน ที่เวลา 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ ก. แต่เปลี่ยนเวลาในการเจาะเลือดสัตว์ทดลองเพื่อนำซีรั่มไปวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ transaminases (SGOT และ SGPT) และเวลาในการตัดตับเพื่อนำไปบด เพื่อตรวจหาปริมาณ DNA ในตับ และวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ thymidine kinase ตลอดจนการตรวจทางพยาธิวิทยา (24 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน) ดังนี้

T_2 (24 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_3 (36 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_4 (48 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_5 (72 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

3.3 <u>การเตรียมเลือดเพื่อหาระดับ SGOT และ SGPT ในซีรั่ม</u>

3.3.1 ทำให้หนูสลบโดยใส่ลงในขวดโหลดมยาสลบที่มีสำลีชุบ diethylether

3.3.2 นำหนูออกมาจากขวดโหลแล้วทำการเจาะเลือดจาก retro-orbital plexus บริเวณมุมหัวตาของหนูโดยใช้ heparinized capillary tube

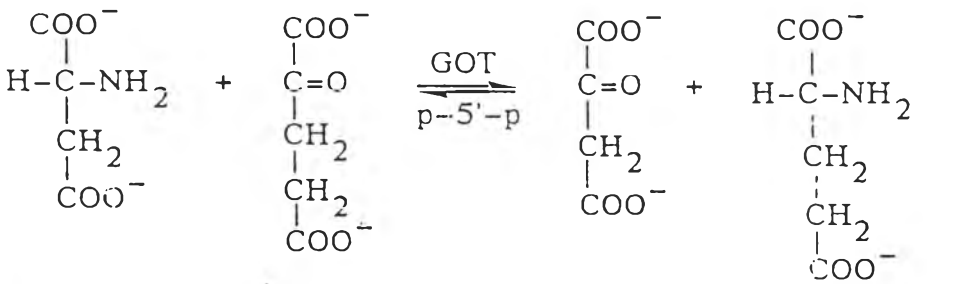
3.3.3 รองรับเลือดจากปลาย capillary tube ให้ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3.3.4 นำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 30 นาที

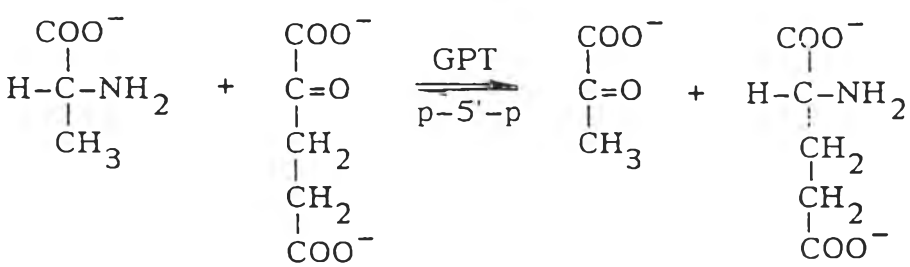
3.3.5 นำส่วนใสที่เป็นซีรั่มแยกใส่ใน microcentrifuge tube แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ 4 ^{o}C ถ้ายังไม่นำไปวิเคราะห์ควรเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4-8 ^{o}C เก็บไว้ได้ประมาณ 3-5 วันโดยไม่ทำให้ระดับของเอนไซม์ SGOT และ SGPT เปลี่ยนแปลง (LaDue, Wroblewski and Karman, 1954)

3.4 <u>การตรวจวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT</u>

โดยอาศัยหลักการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่อะมิโน (transamination) ของกรดอะมิโน เป็นที่ทราบกันดีว่า เอนไซม์ SGOT และ SGPT จะทำหน้าที่ เร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่อะมิโนไปยัง α -oxoacid แล้วทำให้เกิดกรดอะมิโน และ α -oxoacid ตัวใหม่ขึ้น ดังนั้น Reitman และ Frankel (1957) จึงใช้หลักการดังกล่าวนี้ มาใช้ในการวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT โดยใช้การวัดเทียบสี (colorimetric method) จากการทำปฏิกิริยาของ α -oxoacid ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยากับ 2, 4-dinitrophenylhydrazine ทำให้ได้สาร phenylhydrazone ของ α -oxoacid ซึ่งจะให้สีในภาวะที่เป็นด่าง (Reitman and Frankel, 1957) ดังแสดงในรูปภาพที่ 15.



L-aspartate α-oxoglutarate oxaloacetate L-glutamate



L-alanine α-oxoglutarate pyruvate L-glutamate

รูปภาพที่ 15. แสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ SGOT และ SGPT

(Reitman and Frankel, 1957)

วิธีการวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT

1. ใส่ GOT หรือ GPT substrate ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตามจำนวนตัวอย่างที่ต้องการ
2. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ในอ่างน้ำร้อน นาน 5 นาที
3. เติมซีรั่มที่ต้องการวัดลงไป 0.1 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
4. ผสม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ในอ่างน้ำร้อน นาน 30 และ 15 นาที สำหรับการตรวจ GOT และ GPT ตามลำดับ
5. เติม dinitrophenylhydrazine ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
6. ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที
7. เติม 0.4 N NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
8. ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
9. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank สำหรับ set ศูนย์
10. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาระดับ GOT และ GPT activity จาก standard calibration curve จะได้ค่า SGOT และ SGPT ที่ต้องการวัดโดยผลการตรวจวิเคราะห์แสดงหน่วยเป็น SF units/ml

วิธีการหา standard calibration curve

อาศัยการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของ standard pyruvate และ substrate ดังนี้

No.	pyruvate (ml)	GOT/GPT substrate (ml)	H_2O (ml)	GOT activity (SF units/ml)	GPT activity (SF units/ml)
1	0	0.50	0.1	0	0
2	0.05	0.45	0.1	20	25
3	0.10	0.40	0.1	55	50
4	0.15	0.35	0.1	95	83
5	0.20	0.30	0.1	148	126

1. เติม dinitrophenylhydrazine ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทุกหลอดทดลอง
2. ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที
3. เติม 0.4 N NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกหลอดทดลอง
4. ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

5. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank สำหรับ set ศูนย์
6. plot curve ระหว่าง GOT activity และ GPT activity กับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละค่า
7. ลากเส้นต่อแต่ละจุด จะได้ calibration curve ของการวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT

หมายเหตุ

1. hemolyzed serum จะทำให้ได้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์ GOT เป็น 15 เท่าของที่มีอยู่ในซีรั่ม ส่วนเอนไซม์ GPT เป็น 7 เท่าของที่มีอยู่ในซีรั่ม
2. lipemic serum จะทำให้ค่าที่ได้ผิดไป เนื่องจากความขุ่น
3. ซีรั่มควรแยกออกภายใน 2 ชั่วโมง นับจากเจาะเลือดและเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 ^{o}C ถ้ายังไม่ตรวจทันที
4. ควรให้ทุกหลอดทดลองมีช่วงเวลาการทำปฏิกิริยาเท่ากันทุกหลอดและควรเท่ากันทุกครั้ง โดยเฉพาะ GOT ที่ใช้เวลา incubate นาน 30 นาที มีโอกาสผิดพลาดจากสาเหตุนี้ได้ค่อนข้างมาก
5. ซีรั่มที่ขุ่นมากควรทำ serum blank โดยทำเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ทำการทดสอบ แต่ใส่ซีรั่มหลังจากเติม dinitrophenylhydrazine เรียบร้อยแล้ว และใช้ serum blank สำหรับ set ศูนย์แทน
6. ตัวอย่างที่มีค่าเอนไซม์ SGOT และ SGPT สูงกว่าค่าที่มีใน standard calibration curve ให้เจือจางซีรั่มด้วยน้ำกลั่น แล้วคูณค่าที่ได้จากกราฟด้วย diluiton factor

3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ในตับ

เดิมการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA นั้น มักใช้วิธีการวัดเทียบสี (colorimetric method) จากการทำปฏิกิริยาของ diphenylamine กับน้ำตาล pentose ใน nucleic acids ด้วยวิธีของ Schneider (1957) แต่เนื่องจากต้องอาศัยการสกัดแยก ribonucleic acid (RNA) ออกจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาก่อนทำการทดสอบหาปริมาณของ DNA แม้มีการปรับปรุงวิธีการทดสอบโดยการเติม acetaldehyde ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดความไวของวิธีการตรวจสอบมากขึ้นก็ตาม ยังคงต้องอาศัยระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานานอย่างน้อย 12-17 ชั่วโมง (Burton, 1956)

จึงได้มีการศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ในเนื้อเยื่อต่างๆขึ้น โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาของสารเรืองแสง (fluorochrome) กับ DNA ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงของสารเรืองแสงขึ้น (fluorometric method) ทั้งในเซลล์ (Holmquist, 1975) และใน crude tissue homogenate (Brunk, Jones, and James, 1979) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณ DNA จำนวนน้อยๆ (นาโนกรัม) ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ดังนั้น Labraca และ Paigen (1979) จึงได้อาศัยหลักการดังกล่าวนี้มาปรับปรุงวิธีการ

วิเคราะห์หาปริมาณ DNA โดยการใช้ Hoechst 33258 ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ DNA ที่ตำแหน่ง adenine-thymine base pairs (Weisblum and Haenssler, 1974) fluorescence ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจะเพิ่มมากขึ้นเป็น 30-60% ใน high salt buffer ที่ excitation 356 นาโนเมตร และ emission 458 นาโนเมตร โดยมีความจำเพาะ (specificity) กับ DNA (fluorescence ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่มี RNA จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มมากขึ้น) และมีความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ปริมาณ DNA จำนวนน้อยๆ เพียง 10 นาโนกรัม ได้ โดยอาศัยระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 2-3 นาที เท่านั้น (100% enhancement) และ ปฏิกิริยา stable อยู่นานอย่างน้อย 16 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาหาปริมาณของ DNA โดยใช้ 4′, 6-diamidino-2-phenylindole ·2HCl (DAPI) เปรียบเทียบกับการใช้ Hoechst 33258 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณ DNA จำนวนน้อยๆเพียง $5x10^{-10}$ กรัมต่อมิลลิลิตร ได้ เมื่อใช้ high salt buffer เช่นกัน (Kapuscinski and Skoczylas, 1977)

<u>ขั้นเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์</u>

1. phosphate-saline buffer (DNA buffer) ประกอบด้วย 0.05 M NaH_2PO_4, 0.05 M Na_2HPO_4 และ 2 M NaCl โดยปรับ pH 7.4 ด้วย 4 N NaOH
2. Hoechst 33258 dye (H-stain) โดยการเตรียม stock solutions ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น working solutions เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 °C ได้นานอย่างน้อย 6 เดือน (ควรเก็บไว้ในที่ที่ไม่มีแสง)
3. reaction reagent โดยผสม H-stain working solutions (32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงใน DNA buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

<u>วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของ DNA ในตับ</u>

1. เตรียม blank (tris-HCl buffer) และ crude liver homogenate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน acrylic cuvet ต่อ 1 ตัวอย่าง
2. ใส่ reaction reagent ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
3. ปิด acrylic cuvet ด้วย parafilm แล้วผสมโดยการพลิกกลับไปกลับมาเล็กน้อย
4. ทิ้งไว้โดยไม่ให้โดนแสงที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง
5. นำไปวัดความเข้มของ fluorescence ด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ excitation 356 นาโนเมตร และ emission 450 นาโนเมตร โดยใช้ blank สำหรับ set ศูนย์
6. นำค่าความเข้มที่วัดได้ไปหาปริมาณของ DNA ในตับ จาก standard calibration curve จะได้ค่าปริมาณของ DNA ในตับ ที่ต้องการวัด โดยผลการตรวจวิเคราะห์แสดงหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเนื้อเยื่อตับ 1 กรัม

วิธีการหา standard calibration curve

โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ standard DNA (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนี้

No.	DNA buffer (μl)	standard DNA (μl)	DNA content (μg)
1	100	0	0
2	90	10	0.5
3	80	20	1.0
4	60	40	2.0
5	40	60	3.0
6	20	80	4.0
7	0	100	5.0

1. ใส่ raction reagent ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
2. ปิด acrylic cuvet ด้วย parafilm แล้วผสมโดยการพลิกกลับไปกลับมาเล็กน้อย
3. ทิ้งไว้โดยไม่ให้โดนแสงที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง
4. นำไปวัดความเข้มของ fluorescence ด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ excitation 356 นาโนเมตร และ emission 450 นาโนเมตร โดยใช้ blank สำหรับ set ศูนย์
5. plot curve ระหว่างปริมาณของ DNA ในตับกับค่าความเข้มของ fluorescence ของแต่ละค่า
6. ลากเส้นต่อแต่ละจุด จะได้ calibration curve ของการวิเคราะห์หาปริมาณของ DNA ในตับ

หมายเหตุ

1. เนื่องจาก Hoechst 33258 เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) จึงควรสวมถุงมือทุกครั้งที่ต้องสัมผัส
2. ความเข้มของ fluorescence จะลดลงเมื่อปฏิกิริยาประกอบด้วย cations หรือ heavy metal cations บางตัว เช่น magnesium, calcium, citrate และ manganese เป็นต้น (Kapuscinski and Skoczylas, 1977; Brunk, Jones, and James, 1979)
3. ตัวอย่างที่มีค่าความเข้มของ fluorescence สูงกว่าค่าที่มีใน standard calibration curve ให้เจือจางด้วย DNA buffer แล้วคูณค่าที่ได้จากกราฟด้วย dilution factor

3.6 การวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ thymidine kinase

จากการศึกษาเกี่ยวกับการทดแทนเซลล์เก่าที่ถูกทำลายด้วยพิษต่อตับจากสารเคมีหรือยาต่างๆ ตลอดจนการทำให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ตับโดยการตัดตับออกเป็นบางส่วน (partial hepatectomy) นั้น ส่วนใหญ่มุ่งศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ thymidine kinase (ATP:thymidine 5′-phosphotransferase) ซึ่งทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา phosphorylation ของ deoxythymidine ไปเป็น thymidine monophosphate ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Klemperer and Hayes, 1968) ในการทดลองครั้งนี้ได้ปรับปรุงวิธีการทดลองของ Kaln และคณะ (1980) เพื่อใช้วิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ thymidine kinase ดังนี้

วิธีการวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ thymidine kinase

1. นำ 20% (w/v) liver homogenate ไป centrifuge ด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 24,000 rpm (36,000 g) ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นาน 30 นาที
2. นำ supernatant ใส่ลงใน microcentrifuge tubes โดยหลีกเลี่ยงไขมันที่ลอยอยู่บริเวณชั้นบนสุดของ supernatant
3. เตรียม reaction mixture ในหลอดทดลอง ต่อ 1 ตัวอย่าง ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

50 mM	tris-HCl buffer (pH 7.4)	ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
16.67 mM	ATP	ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
18 mM	$MgCl_2$	ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
0.1 mM	[^{3}H] thymidine	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
supernatant		ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

4. ปิดหลอดทดลองด้วย parafilm นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C นาน 10 นาที
5. หยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดทดลองวางในน้ำต้มเดือด นาน 2 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำแข็งให้เย็นลง
6. นำไป centrifuge ที่ 945 rpm (100 g) เพื่อแยก denatured protein ออก
7. นำ supernatant ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน DEAE-cellulose discs ขนาด 1x1 เซนติเมตร
8. นำ DEAE-cellulose discs ล้างด้วย 1 mM ammonium formate ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 5 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เช่นกัน นาน 3 นาที
9. ล้าง discs ซ้ำอีกครั้งตามวิธีในข้อ 8.
10. จากนั้นปล่อย discs ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปใส่ใน scintillation vials
11. เติม 0.1 M HCl/0.2 M KCl solution จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละตัวอย่าง

11. นำ scintillation vials มาสั่น นาน 15 นาที แล้วจึงเติม Aquasol จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงใน vials เขย่าอย่างแรงและผสมจนได้สารละลายใส
12. นำ discs ไปตรวจวัดหาระดับเอนไซม์ thymidine kinase ด้วยเครื่อง scintillation counters ซึ่งมีค่า detector coefficient 68% โดยผลการตรวจวัดแสดงหน่วยเป็น pmol/mg protein/min โดยอาศัยวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ Lowry และคณะ (1951) ปรับปรุงวิธีการโดย Peterson (1977)

3.7 วิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในตับ

โดยอาศัยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ปรับปรุงวิธีการโดย Peterson (1977) ด้วยวิธีการวัดเทียบสี (colorimetric method) เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายด่าง เกิดเป็น co-ordinated complex กับอะตอมของ nitrogen ใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงินขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ deoxycholate (DOC ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ trichloroacetic acid (72% w/v TCA) ใส่ลงในปฏิกิริยาก่อนทำการวิเคราะห์ เพื่อป้องกัน interfere จากสารเคมีบางตัว ต่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการของ Lowry และคณะ เช่น tris, ammonium sulfate, EDTA, sucrose, citrate, amino acid และ peptide buffers เป็นต้น

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนในตับ

1. เตรียม blank (น้ำกลั่น) และ supernatant ของ 20% liver homogenate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ต่อ 1 ตัวอย่าง
2. เติม DOC (ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
3. ผสมแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
4. เติม TCA (72% w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง ผสมแล้วนำไป centrifuge ที่ 2,000 rpm (450 g)
5. นำตะกอนมาเติม Lowry reagent (1% w/v copper sulfate ใน 1% w/v potassium tartrate 1 ส่วน เจือจางใน 10 ส่วน ของ 10% w/v sodium carbonate ใน 0.5 N sodium hydroxide) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วจึงเทตัวอย่างลงในหลอดทดลองใหม่
6. ล้างหลอดทดลองเดิมด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง เทผสมลงในแต่ละตัวอย่าง
7. ผสมแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที
8. เติม Folin & Ciocalteu's Phenol reagent (เจือจางด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 : 10) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
9. ผสมแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
10. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ blank สำหรับ set ศูนย์

11. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาปริมาณโปรตีนในตับ จาก standard calibration curve โดยแสดงผลการตรวจวิเคราะห์เป็น มิลลิกรัม
12. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ blank สำหรับ set ศูนย์
13. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาปริมาณโปรตีนในตับ จาก standard calibration curve โดยแสดงผลการตรวจวิเคราะห์เป็น มิลลิกรัม

วิธีการหา standard calibration curve

โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงปริมาณ standard bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

No.	standard BSA (ml)	H_2O (ml)	protein concentration (µl/ml)
1	0	1.0	0
2	0.1	0.9	40
3	0.2	0.8	80
4	0.5	0.5	200
5	0.8	0.2	320
6	1.0	0	400

1. เติม DOC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
2. ผสมแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
3. เติม TCA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง ผสมแล้วนำไป centrifuge ที่ 2,000 rpm (450 g)
4. นำตะกอนมาเติม Lowry reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วจึงเทตัวอย่างลงในหลอดทดลองใหม่
5. ล้างหลอดทดลองเดิมด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง เทผสมลงในแต่ละตัวอย่าง
6. ผสมแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที
7. เติม Folin & Ciocalteu's Phenol reagent (เจือจางด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 : 10) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
8. ผสมแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
9. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ blank สำหรับ set ศูนย์

10. plot curve ระหว่างปริมาณของโปรตีนในตับกับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละค่า
11. ลากเส้นต่อแต่ละจุด จะได้ calibration curve ของการวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนในตับ

หมายเหตุ

1. เพื่อป้องกัน interfere จากสารที่ฤทธิ์เป็นได้ทั้งกรดและด่าง (ampholyte) ควรเติม 0.1 M NaCl ลงในปฏิกิริยาก่อนเติม DOC
2. ในกรณีที่ cuvet ต้องการปริมาตรมากกว่า 2.5 มิลลิลิตร ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง ให้เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการลงในทุกหลอดทดลองก่อนการตรวจวัด
3. ตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าค่าที่มีใน standard calibration curve ให้เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น แล้วคูณค่าที่วัดได้จากกราฟด้วย dilution factor

3.8 การตรวจทางพยาธิวิทยาโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)

เพื่อศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของเซลล์ตับที่เกิดขึ้นภายหลังการก่อพิษต่อตับจากอะเซตามิโนเฟน โดยอาศัยวิธีการใช้ลำแสงอิเล็กตรอน (electron beam) ทะลุผ่านตัวอย่างที่ต้องการศึกษา การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็นและสำคัญมาก เพื่อให้ได้ภาพของตัวอย่างที่มีคุณภาพและมีรายละเอียดชัดเจน

ชิ้นเนื้อตับหนูขาวที่ได้จากการทดลองในการวิจัยครั้งนี้ ได้รับการตรวจและแปลผลทางพยาธิวิทยา โดย ศาสตราจารย์ นายแพทย์ วีระ กสานติกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปศึกษาโดยการใช้ TEM นั้น มี 7 ขั้นตอน (อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, 2531; ศิริเพ็ญ เวชชการันย์, อรัญญา ตันติปัญจพร และวิรัช ธรรมวินิจฉัย, 2535) ดังนี้

1. การตัดตัวอย่าง (cutting)

เนื่องจากการศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์ตับด้วย TEM นั้น ตัวอย่างต้องมีความบางพอที่ลำแสงอิเล็กตรอนจะผ่านไปได้ ความหนาของตัวอย่างจึงไม่ควรเกิน 1 มิลลิเมตร และควรตัดแต่งเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว โดยทำในน้ำยาดอง (fixative, fixing agent) เพื่อให้สารเคมีเข้าไปทำปฏิกิริยาภายในเซลล์ระหว่างที่ทำการตัดแต่ง ช่วยลดความเสียหายขององค์ประกอบภายในเซลล์ มีดที่ใช้ในการตัดแต่งต้องมีความคมมาก เพื่อป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นจากแรงกดของมีด ซึ่งอาจทำให้เกิดความชอกช้ำหรือเซลล์แตกได้

2. การดองตัวอย่าง (fixation)

เพื่อรักษาองค์ประกอบภายในเซลล์ให้คงสภาพทั้งทางด้านขนาดและรูปร่างให้ได้มากที่สุด และเป็นการเตรียมตัวอย่างให้มีความทนต่อขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างต่อๆไป โดย fixative ที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ

2.1 primary fixative : 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพของเซลล์และองค์ประกอบภายในให้คงสภาพเดิมได้ โดยการเกิด crosslinkage ได้เป็นอย่างดีกับโปรตีนที่ reactive side chain (amino group) โดยมีอัตราการแทรกซึม (penetration) ช้า

2.2 secondary fixative (postfixative) : 2% osmium tetroxide (OsO_4) ซึ่งมีอัตราการแทรกซึมและเกิดปฏิกิริยากับองค์ประกอบของเซลล์ได้หลายชนิด โดยส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยาได้ดีกับ unsaturated lipid โดยจะเกิด crosslinkage ที่บริเวณ double bond ของ unsaturated lipid จึงเหมาะในการ fix membrane และโครงสร้างที่ประกอบด้วยไขมัน

3. การล้าง (washing)

เป็นการป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่าง fixative กับ dehydrating agent โดยการใช้ 0.1 M phosphate buffer (ชนิดเดียวกันกับตัวทำละลายของ fixative) ล้างตัวอย่าง 3 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที ก่อนทำการดองตัวอย่างด้วย OsO_4

4. การแทนที่น้ำภายในเซลล์ด้วยสารอินทรีย์ (dehydration)

เนื่องจากพลาสติกผสมในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างขั้นต่อๆไปไม่สามารถแทนที่น้ำได้โดยตรง จึงใช้ ethanol ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (70% 80% 95% และ absolute ethanol) ในการแทนที่น้ำ ใช้เวลาประมาณ 10 นาที ในแต่ละระดับความเข้มข้น

5. การแทนที่และฝังตัวอย่างด้วยพลาสติกผสม (infiltration and embedding)

เพื่อเสริมความแข็งแรงของเนื้อเยื่อ สามารถตัดตัวอย่างได้ดีขึ้น ตลอดจนมีความทนต่อการเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างต่อๆไป และทนต่อลำแสงอิเล็กตรอน

เนื่องจากสารที่ใช้เป็นพลาสติกผสมละลายใน ethanol ได้ไม่ดีพอ จึงต้องใช้ propylene oxide (CH_3CHOCH_2) เข้าไปแทนที่ dehydrating agent (ethanol) ก่อน โดยใช้เวลาประมาณ 10 นาที จากนั้น จึงใช้ propylene oxide ผสมกับพลาสติกผสม (Resin, Epon 812) ในอัตราส่วน 1:1 เข้าไปแทนที่ propylene oxide โดยใช้เวลาในขั้นตอนนี้อีก 3-5 ชั่วโมง

ขั้นตอนต่อไปเป็นการฝังตัวอย่างด้วยพลาสติกผสม (embedding) โดยการใช้ resin บริสุทธิ์เข้าไปแทนที่ dehydrating agent อย่างสมบูรณ์ ใช้เวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำชิ้นตัวอย่างที่ได้ไปใส่ในภาชนะหรือแม่พิมพ์ที่เหมาะสม (embedding mold) แล้วเททับด้วยพลาสติกเหลวให้เต็ม สารพลาสติกจะเข้าสู่เซลล์ในลักษณะของ monomer เมื่อเพิ่มอุณภูมิเป็น 60 ^{o}C เป็นเวลานาน 3 วัน จะเกิดปฏิกิริยาเป็น cross-linked polymer เกิดขบวนการ polymerization ขึ้น

6. การตัด (sectioning)

นำ embedding mold ที่ได้มาแกะเอาตัวอย่างที่ฝังในพลาสติกออกมาตัดเป็นแผ่นบางๆ ด้วยเครื่อง ultramicrotome โดยการตัดตัวอย่างที่ดีนั้นสามารถสังเกตได้จากสีที่สะท้อนแสงไฟออกมาเป็นสีเงินอย่างชัดเจน และตัวอย่างต้องไม่มีรอยย่นหรือฉีกขาด

7. การย้อมสี (staining)

เป็นการนำตัวอย่างที่ตัดแล้ววางลงบน grid เพื่อให้ตัวอย่างได้สัมผัสกับสารละลายเกลือของโลหะหนัก ทำให้อิเล็กตรอนวิ่งผ่านได้ยาก มักใช้ uranyl เข้าไปทำปฏิกิริยากับ nucleic acid และโปรตีน จากนั้นจึงใช้ lead ย้อมตัวอย่างตาม เพื่อให้เข้าไปทำปฏิกิริยากับ phospholipid และ glycogen เป็นผลให้องค์ประกอบภายในเซลล์เกิดความแน่นที่แตกต่างกันไป เกิด contrast เพิ่มขึ้น

4. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. <u>การแสดงผลการทดลอง</u> เป็น 2 ลักษณะ คือ
   1.1 ตาราง
   1.2 แผนภูมิแท่งและกราฟเส้น

2. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>
   2.1 นำเสนอข้อมูล เป็น ค่าเฉลี่ย และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SEM)
   2.2 Student's t-test สำหรับข้อมูลในกลุ่มเดียวกันที่เวลาต่างกัน
   2.3 One-way analysis of variance หรือ ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้โดยวิธี Duncan's new multiple range test สำหรับข้อมูลต่างกลุ่มที่มีมากกว่า 1 กลุ่ม ที่เวลาเดียวกัน