บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวเพศผู้ (wistar albino rats) น้ำหนักระหว่าง 160-200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม เลี้ยงก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมสลับช่วงเวลามืดและสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ให้อาหารสำเร็จรูป และน้ำสะอาด ไม่จำกัดปริมาณ

2 การเตรียมผงบดแห้งของสารสกัดจากมะขามป้อม

ผงบดแห้งของสารสกัดจากผลสดของมะขามป้อมเตรียมจากผลมะขามป้อมที่เก็บจาก อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช ช่วงเวลาที่เก็บ ตุลาคม พ.ศ. 2546 ถึง กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 นำมาแยกเอาเฉพาะส่วนเนื้อ แล้วสกัดด้วยเอทานอล 50%สองครั้ง จากนั้นกรองด้วยผ้าและกระดาษกรอง นำไปแยกตัวทำละลายด้วยเครื่อง evaporator และนำไปทำเป็นผงบดแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer นำมาบดให้ละเอียดจนได้ผงมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองนวลจากนั้นเก็บใส่ภาชนะปิดให้สนิทเพื่อป้องกันความชื้นและแสง เก็บไว้ในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดผลมะขามป้อม

พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรโดยแสดงเป็น Chromatogram ของสารสกัดมะขามป้อมด้วย HPLC (Finger print), HPLC Column: Alltech Altima C18 4.6 x 150 mm, 5 micron, Mobile Phase: Methanol: 0.3%v/v Trifluoroacetic Acid (5:95), Flow rate: 1.0 ml/min, Detection: 270 nm, Injection Volume: 20 µl พบ peak ของสารสำคัญ ณ เวลา (Retention time) ต่าง ๆ ดังนี้ ณ เวลา 2.812 นาที ปริมาณ 23.203 %, 6.649 นาที ปริมาณ 24.610 %, 7.231 นาที ปริมาณ 20.569 %, 12.348 นาที ปริมาณ 7.178 % และ 13.723 นาที ปริมาณ 11.803 % (รูปที่ 27 ภาคผนวก)

4 วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองที่1 ศึกษาผลปกป้องตับของสารสกัดมะขามป้อมในหนูขาวที่ได้รับเอทานอลในระยะเฉียบพลัน

แบ่งหนูขาวออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัวดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 กลุ่มเอทานอล ได้รับเอทานอล 5 กรัม/กิโลกรัม

กลุ่มที่ 3, 4 และ 5 กลุ่มสารสกัดมะขามป้อม ได้รับสารสกัดมะขามป้อม 25, 50 และ 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 4 ชั่วโมงก่อนให้เอทานอล 5 กรัม/กิโลกรัม

กลุ่มที่ 6 กลุ่มสารซิไลมารีน ได้รับสารซิไลมารีน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 4 ชั่วโมงก่อนให้เอทานอล 5 กรัม/กิโลกรัม

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลปกป้องตับของสารสกัดมะขามป้อมในหนูขาวที่ได้รับเอทานอลในระยะกึ่งเฉียบพลัน

แบ่งหนูขาวออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัวดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ทางปากเป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 2 กลุ่มเอทานอล ได้รับเอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัม ทางปากเป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 3 กลุ่มเอทานอล ได้รับเอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัม ทางปากเป็นเวลา 21 วัน จากนั้นไม่ให้ intervention ใดๆ ได้รับเฉพาะน้ำและอาหาร เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 4 ได้รับเอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัม ทางปากเป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้น ได้รับสารสกัดมะขามป้อม 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 5 ได้รับเอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัม ทางปากเป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้น ได้รับสารซิไลมารีน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 6 ได้รับเอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัม ทางปากเป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้น ได้รับสารสกัดมะขามป้อมและสารซิไลมารีน โดยลดขนาดลงครึ่งหนึ่งของสารสกัดมะขามป้อมและสารซิไลมารีนที่ได้รับในกลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นเวลา 7 วัน

หลังจากนั้นหนูขาวในกลุ่มต่างๆทั้งใน การทดลองที่ 1 และ 2 (ระยะ เฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน) ได้รับการอดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อน sacrificed โดยการดมสลบด้วยอีเธอร์ และเก็บตัวอย่างเลือดและตับเพื่อนำไปตรวจค่าทางเคมีคลินิก ได้แก่ การวิเคราะห์หาระดับ ALT, AST, triglyceride, TNF-alpha, IL-1 ใน serum และ วิเคราะห์หาระดับ hepatic triglyceride, hepatic GSH, hepatic MDA ในเนื้อเยื่อตับ และการตรวจรอยโรคโดยตรวจ Histopathology

<u>วิธีการเก็บตัวอย่างและการตรวจค่าทางเคมีคลินิก</u>

1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1.1 ขวดโหลดมยาสลบหนู

1.2 บีกเกอร์

1.3 Appendroff tube สำหรับใส่เลือด

1.4 สำลี

1.5 syringes และ เข็มเบอร์ 21

1.6 สายยางและเข็มสำหรับ perfuse ตับ

1.7 กรรไกรและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผ่าตัด

1.8 ตาชั่ง (Mettler Toledo, AG 135, Switzerland)

1.9 Glass homogenizer (Heidolph, RK 3, Germany)

1.10 Motor homogenizer (Heidolph, RK 3, Germany)

1.11 แผ่น foil ขนาด 3 x 4 นิ้ว

1.12 ขวดใส่ชิ้นเนื้อขนาด 60 มิลลิลิตร สำหรับส่งทำการตรวจทาง histopathology

1.13 หลอดทดลอง

1.14 เครื่องช่วยผสม (laboratory mixer; Ikamag, NR 245060, Germany)

1.15 อ่างน้ำร้อน (water bath; Heto, 21AT, Denmark)

1.16 ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 50-1,000 µl (automatic pipette; Gilson, U54756, France)

1.17 Cuvettes ทรงสี่เหลี่ยม (Starna, IG6 3UT, USA)

1.18 Spectrophotometer (LKB Biochrom, Ultraspec II, England)

1.19 Automatic high speed refrigerated centrifuge (Hitachi, Himac SCR 20B/18B, Germany)

1.20 pH meter (Beckman,12 pH/ISE, USA)

1.21 Votex mixer (Vortex genie, 2-G-5OE, USA)

1.22 Timer

1.23 Cryocut (Leica, Cm 1800, USA)

1.24 Microplate reader (Anthos, htII, USA)

2 สารเคมี

Sodium phosphate monobasic ($NaH_2PO_4H_2O$), Conc.NaOH, Paraformaldehyde, Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), 5,5 Dithiobenzoic acid, Sulfosalicylic acid, Hydrochloric acid (HCL) solution, Trichloroacetic acid (TCA), Thiobarbituric acid (TBA),

NaCl, Sodium phosphate dibasic anhydrous, Potassium phosphate monobasic anhydrous, Glycerol, 10% KOH, Isopropanol, Anhydrous ammonium acetate, Glacial acetic acid, Sodium metaperiodate, 2,4-Pentonedione, H_2SO_4, Heptane, Trioleine standard, Diethylether

3 วิธีการเก็บตัวอย่าง

3.1 ทำการสลบหนูขาว โดยนำหนูใส่ในขวดโหลดมยาสลบที่มี Diethylether

3.2 เมื่อหนูสลบแล้ว นำหนูออกจากขวดโหล จากนั้นนำหนูมาผ่าตัดเปิดหน้าท้องและทำการเจาะเลือดจาก หลอดเลือดส่วน inferior vena cava

3.3 หลังจากนั้นตัดส่วนของ inferior vena cava ให้เปิดกว้างออก ไล่เลือดออกจากตับโดยใช้ 0.9 % NaCl จนสีตับซีดลงและน้ำที่ไหลออกมาจาก inferior vena cava ใส

3.4 เก็บเลือดที่ได้ใส่ใน Appendroff tube แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ 4 ^{o}C

3.5 เลาะตับออกจากตัวหนูขาว นำไปล้างเลือดที่เกาะอยู่ภายนอกออกด้วย 0.9 % NaCl

3.6 นำตับไปชั่งนำหนักทั้งหมดจากนั้น นำไปแช่ในน้ำแข็งทันที แยกส่วนหนึ่งไปตรวจทาง histopathology และตรวจถุงไขมันในตับ ส่วนที่เหลือนำไป homogenize เพื่อวัดหาระดับ hepatic triglyceride, hepatic GSH, hepatic MDA ในเนื้อเยื่อตับ

3.7 นำ Appendroff tube ที่มีเลือดไปปั่นแยกเอาส่วน serum ด้วยเครื่อง centrifugeที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บแยกเป็นสองส่วนสำหรับตรวจหาระดับ ALT, AST, Serum triglyceride, TNF-alpha และ IL-1beta

5 การตรวจค่าทางเคมีคลินิก

5.1 การวิเคราะห์ระดับ serum ALT, AST

สำหรับในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ reagent สำเร็จรูป ประกอบด้วยสับสเตรตและ reagent โดยอาศัยหลักการในการทำงานแบบจลนศาสตร์ของเอ็นไซม์ ยึดหลักตามวิธีการของ IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) เทคนิค

วิธีการวิเคราะห์หาระดับเอ็นไซม์ AST และ ALT

- ใส่ reagent สำหรับวัด AST หรือ ALT ปริมาณ 500 µl ลงในหลอดทดลองตามจำนวนตัวอย่างที่ต้องการ
- นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ในอ่างน้ำร้อน (water bath)

- เติมซีรั่มที่ต้องการวัดลงไป 50 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง

- นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 340 nm ณ เวลาที่ 1, 2, 3 และ 4 นาทีตามลำดับ

- นำค่าการดูดกลืนแสง มาคำนวณหาระดับเอ็นไซม์

ข้อควรระวังคือการเก็บตัวอย่างเลือดควรระวังการแตกของเม็ดเลือดเนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีเอ็นไซม์ทั้งสองอยู่ในระดับหนึ่งจึงอาจทำให้ค่าที่ได้สูงขึ้นจากค่าจริงในตับได้

5.2 การวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอร์ไรด์ในซีรั่ม

- นำ reagent สำเร็จรูปสำหรับวัดระดับไตรกลีเซอร์ไรด์ มา incubate ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้

- ทำการวิเคราะห์โดยเติมสารต่างๆ ลงไปตามลำดับดังนี้

	Blank	Sample/Standard
Reagent	1.0 ml	1.0 ml
Redistilled water	10 µl	-
Sample/Standard	-	10 µl

- ผสมด้วยเครื่องผสมและ incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

- หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 nm

5.3 การวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอร์ไรด์ในตับ

สำหรับหลักการวิเคราะห์ไตรกลีเซอร์ไรด์ โดยใช้เทียบสีตามวิธีของ Mendez และคณะ (1959) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หากลีเซอรอล ซึ่งเกิดจากการไฮโดรไลส์ไตรกลีเซอร์ไรด์ ด้วยสารละลายด่าง ซึ่งเป็นกระบวนการที่เรียกว่า "สะปอนนิฟิเคชั่น" (saponification) จากนั้นกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดส์ด้วยเปอร์ไอโอเดท ได้เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารที่ทำให้เกิดสีได้แก่ อะเซทิลอะซีโตน แล้วได้สารสีเหลือง

- นำตับมาล้างด้วย 0.9 % NaCl อีกครั้งจากนั้น นำตับมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำมา homogenize ร่วมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บดด้วยเครื่อง Motor homogenizer จนเป็นเนื้อเดียวกัน

- เตรียมหลอดทดลอง ตามจำนวนที่ต้องการ ใช้ปิเปตดูดเนื้อเยื่อตับที่ต้องการวิเคราะห์หลอดทดลองละ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง และเตรียมสารละลายมาตรฐาน triolein 10, 20, 30 และ 40 ไมโครลิตร เพื่อทำเป็น standard เพื่อเทียบหาระดับไตรกลีเซอร์ไรด์ของตับในแต่ละตัวอย่าง และหลอดทดลองที่ใช้เป็น blank 1 หลอด

- ทำการวิเคราะห์โดยเติมสารต่างๆ ลงไปตามลำดับดังนี้

สารและตัวอย่าง	Liver homogenate (ml)	Blank (ml)
Liver homogenate	0.5	-
H_2O	0.5	0.5
Heptane	2.0	2.0
Isopropanol	3.5	3.5
$4\%H_2SO_4$	1.0	1.0

- ผสมด้วยเครื่องผสมแล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนบน 0.2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง และปิเปต Isopropanol 2 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสม จากนั้นปิเปต saponificate 0.6 มิลลิลิตร ทำการผสมเข้าด้วยกันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วปิเปต sodium metaperiodate 1.5 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน จากนั้นปิเปต 1.5 มิลลิลิตรของ acetyl acetone ทำการผสมแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 nm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4 การวิเคราะห์ระดับ MDA (Budge and Aust,1978)

- นำตับมาล้างด้วย 0.9 % NaCl อีกครั้งจากนั้น นำตับมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำมา homogenize ร่วมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บดด้วยเครื่อง Motor homogenizer จนเป็นเนื้อเดียวกัน

- เติมสารละลาย TCA-TBA-HCL 3 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน

- Incubate ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- centrifugue ที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- นำส่วนใสด้านบนไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm

5.5 การวิเคราะห์ระดับ GSH (Ellman,1959)

- นำตับมาล้างด้วย 0.9 % NaCl อีกครั้งจากนั้น นำตับมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำมา homogenize ร่วมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บดด้วยเครื่อง Motor homogenizer จนเป็นเนื้อเดียวกัน
- เติมสาร 4% Sulfosalicylic acid ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน และนำไป centrifugue ที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- นำส่วนใสด้านบน ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วย 0.1mM dithiobenzoic acid 4.5 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน
- จากนั้นนำไปวัดด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm

5.6 TNF-Alpha (ELISA)

หลักการระดับของ TNF-Alpha ตรวจวัดได้โดยใช้วิธีการใช้ 96-well strip plate ที่ coated ไว้ด้วย Anti-Rat TNF-Alpha จากนั้นนำไป incubate ด้วย ซีรั่มที่มี TNF-Alpha แล้ว incubate ด้วย Antibody ที่ถูกจับไว้ด้วยเอ็นไซม์ ตัว TNF-Alpha จะถูกจับด้วย Antibody เมื่อใส่ substrate ทำให้เกิดการทำปฏิกิริยากันระหว่างตัวเอ็นไซม์และ substrate แล้วเกิดสีขึ้น จากนั้นนำไปวัดหาปริมาณ TNF-Alpha โดยนำไปวัดค่า absorbance ด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm ค่า absorbance ที่ได้จะนำไปคำนวณหาปริมาณ TNF-Alpha โดยคำนวณจาก standard curve ที่ทราบความเข้มข้น

วิธีการโดยสรุป

1. ใส่ 50 µl ของ pre-treatment buffer ลงในแต่ละหลุม
2. ใส่ 50 µl ของ standard หรือซีรั่ม และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
4. ใส่ 50 µl ของ Biotinylated Antibody reagent และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
6. ใส่ 100 µl ของ Streptavidin-HRP reagent และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
7. ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
8. ใส่ 100 µl ของ TMB substrate solution จากนั้นทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที
9. หยุดปฏิกิริยาโดยใส่ 100 µl ของ stop solution
10. นำไปวัด absorbance ที่ 450 nm

5.7 IL-1 beta (ELISA)

หลักการระดับของ IL-1 beta ตรวจวัดได้โดยใช้วิธีการใช้ 96-well strip plate ที่ coated ไว้ด้วย Anti-Rat IL-1 beta จากนั้นนำไป incubate ด้วย ซีรั่มที่มี IL-1 beta แล้ว incubate ด้วย Antibody ที่ถูกจับไว้ด้วยเอ็นไซม์ ตัว IL-1 beta จะถูกจับด้วย Antibody เมื่อใส่ substrate ก็จะเกิดการทำปฏิกิริยากันระหว่างตัวเอ็นไซม์และ substrate และเกิดสีขึ้นจากนั้นนำไปวัดหาปริมาณ IL-1 beta โดยนำไปวัดค่า absorbance ด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm ค่า absorbance ที่ได้จะนำไปคำนวณหาปริมาณ IL-1 beta โดย คำนวณจาก standard curve ที่ทราบความเข้มข้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการโดยสรุป

1. ใส่ 50 µl ของ Sample diluent ลงในแต่ละหลุม และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
3. ใส่ 100 µl ของ Biotinylated Antibody Reagent ลงในแต่ละหลุมและ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
5. ใส่ 100 µl ของ Streptavidin-HRP Solution ลงในแต่ละหลุมและ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
6. ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
7. ใส่ 100 µl ของ TMB Substrate Solution ลงในแต่ละหลุม จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
8. หยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 100 µl ของ Stop Solution ลงในแต่ละหลุม
9. นำไปวัดค่า Absorbance ด้วย plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

5.8 การทดสอบทาง Histopathology

5.8.1 การทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ด้วยวิธีย้อมสี Hematoxylin & Eosin (H&E) แบ่งเป็น ขั้นตอนดังนี้ (Humason, 1979)

- ดองเนื้อเยื่อ (Fixation) หลังจากได้ชิ้นเนื้อออกมาจากตัวอย่างต้องทำการแช่ชิ้นเนื้อลงในสารละลาย10 % นิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (Neutral buffer formalin)
- การล้าง (Washing) หลังจากดองเนื้อเยื่อด้วยสารละลายนิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน ล้างด้วยน้ำ (tap water) เปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา ใช้เวลา 30 นาที – 1 ชั่วโมง
- การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration) การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมพร้อมให้สารที่ใช้ฝังเนื่อเยื่อ (embedding media) เข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยใช้

สารเอทิลแอลกอฮอล์ โดยนำเนื้อเยื่อผ่านแอลกอฮอล์จากระดับต่ำไปสูงเพื่อป้องกันการหดตัวและการเหี่ยวของเซลล์ที่อาจทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์

- เคลียริ่ง (Clearing) แช่เนื้อเยื่อในสารเคลียริ่งเอเจนต์ (Clearing agent) ไซลีน

- การแทรกซึมของพาราฟิน (Infiltration) แช่เนื้อเยื่อในพาราฟินที่หลอมเหลว

- การฝังเนื่อเยื่อในพาราฟิน (Embedding) เมื่อเนื้อเยื่อผ่านการแทรกซึมของพาราฟินเรียบร้อยแล้ว แล้วทำให้พาราฟินรอบๆเนื้อเยื่อมีอุณหภูมิลดลงจนแข็งในแม่พิมพ์โลหะรูปสี่เหลี่ยม

- การตัดเซกชั่น (Sectioning) ตัดเซกชั่นโดยใช้เครื่องไมโครโตมให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมครอน จากนั้นทำการ mounting และทำการติดเซกชั่นบนสไลด์ จากนั้นนำไปย้อมสี (staining) นอกจากนั้นตับส่วนหนึ่งจะนำไปตัดเซกชั่นที่เรียกว่าวิธีโฟรสเซนเซกชั่น (Frozen section) เป็นการตัดเซกชั่นโดยใช้ความเย็น เครื่องมือที่ใช้ในการตัดโฟรสเซนเซกชั่น เรียกว่า ไครโอสแตต หรือ ไครโอคัต (Cryostat หรือ Cryocut)

- การย้อมสี (Staining) ในที่นี้ทำการย้อมสีโดย haematoxylin and eosin technique ทำโดยขจัดพาราฟินออก จากโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อโดยใช้ไซลีน และนำน้ำเข้าสู่เนื้อเยื้อโดยเริ่มจากแอลกอฮอล์จากระดับสูงไปสู่ระดับต่ำ ย้อมสีครั้งแรกด้วยฮีมาท็อกไซลีน จากนั้นนำไปล้างสีส่วนเกินออกนำเนื้อยื่อแช่ในสารละลาย 1% แอซิดแอลกอฮอล์ และสารละลายอิ่มตัวของลิเทียมคาร์บอเนต จากนั้นย้อมสีซ้ำด้วยสีอีโอซิน นำไปขจัดน้ำออกจากเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ ผ่านกระบวนการเครียริ่งอีกครั้ง เมาต์ด้วยเมาต์ติ้ง มีเดีย และปิดด้วยโคเวอร์กลาส นอกจากนั้นยังทำการย้อมพิเศษ PAS (Periodic acid schiff) เพื่อตรวจวัดไกลโคเจน ผลจะติดสีชมพูม่วงแดง และการย้อมสี Oil red O เพื่อตรวจ lipid droplets ถ้าผลบวกจะติดสีแดงสด (Bright red)

6 การแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

6.1 การแสดงผลการทดลองของค่าเคมีคลินิก แสดงในรูปตาราง

6.2 การแสดงผลการทดลอง histopathology

6. 3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ แสดงค่าเฉลี่ย กับค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SE$) ในการเสนอข้อมูลของพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก โดยใช้ One – way analysis of variance (ANOVA) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Turkey สำหรับข้อมูลต่างกลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย