บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 สัตว์ทดลอง

1.1.1 หนูขาว พันธุ์วิสตาร์ เพศผู้ อายุ 6-7 สัปดาห์ จำนวน 105 ตัว และหนูเพศเมีย พันธุ์วิสตาร์ อายุ 6-7 สัปดาห์ ซึ่งอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ จำนวน 30 ตัว เลี้ยงในเรือนเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งปรับอากาศให้อุณหภูมิห้อง 25 °C และควบคุมแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง ระหว่างเวลา 06.00-20.00 น. มืด 10 ชั่วโมงระหว่างเวลา 20.00-06.00 น. ด้วยเครื่องควบคุมอัตโนมัติ พร้อมทั้งให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์และน้ำดื่มตลอดเวลา

1.1.2 หนูเมาส์พันธุ์สวิส อายุ 24-25 วัน จำนวน 2 ตัว ซึ่งนำมาจากเรือนเลี้ยงหนูภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกับหนูแรท

1.2 สารเคมี สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็น AR grade

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โคเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์ และ HDL

- Cholesterol liquicolor
  enzymatic colourimetric test : cat. -No. : H 8001
  4 X 30 Enzyme reagent.
- Fully enzymatic colourimetric test : cat. -No.
  : H 5008 7 X 15 ml complete test kit.
- HDL Cholesterol test: cat.-No. :H 8206 4 x 80 ml.

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA

- Charcoal reagent : Batch No.K220520 , WHO RIA Reagent Programme Switzerland.
- Dextran : Batch No.82/83/S, WHO RIA Reagent Programme Switzerland.
- Diethyl ether : E.Merck, Darm stadt, Germany
- Dioxan : E.Merck, Darm stadt, Germany.
- Disodium hydrogen phosphate E. Merck, Darm stadt, Germany.
- Gelatin : Difco Laboratories, U.S.A.
- PPO (2,5- Diphenyl Oxazole): Sigma chemical company, U.S.A.
- PoPoP (1,4-bis[5-Phenyl-2-Oxazolyl]benzene: Sigma chemical Company, U.S.A.
- Sodium dihydrogen phosphate E. Merck, Darm stadt, Germany.
- Sodium chloride E. Merck, Darm stadt, Germany.
- Thiomersol (merthiolate) : Sigma chemical Company, U.S.A.
- Toluene : E.Merck, Darm stadt, Germany.

1.3 ฮอร์โมนและแอนติบอดี้

1.3.1 ฮอร์โมน

- Testosterone Standard : Batch No. K 079810, WHO RIA, Reagent Program, Switzerland.

- (1,2,6,7, ^{3}H) testosterone : Batch No.41 TRK 402, Amersham International PLc, England.

1.3.2. แอนติบอดี้

- Antiserum to testosterone : Batch No. K 200710, WHO RIA Reagent Program, Switzerland.

2. อุปกรณ์

- B-Liquid Scintillation Counter: Model. BPL, Packard Intrument Co., U.S.A.
- Cuvette
- Dri-Block Heater : Model DB-3, Tecam Laboratory and Industrial Equipment, U.S.A.
- Dubnoff incubator-Shaker: Model 3575-1, Lab-line instruments Inc. U.S.A.
- Dynac Centrifuge : Clay adams, Becton Dickinson & Company Parsippany, U.S.A.
- Micropipette : Pipetteman M81 Gilson France, Eppendorf 3130 Germany; Pipette Gun Glay Adams, U.S.A
- Vortex mixer : M-16715, Thermolyne Corporation, Iowa, U.S.A.
- pH meter : 5985, Cole parmer Instrument Company, U.S.A.
- Refrigerated Centrifuge : Model PR-J, International Equipment Company U.S.A.

- Drying Cabinet Series 2000, Termarks, U.S.A.
  Termaks, U.S.A.
- Spectrophotometer : Pharmacia LKB Biochrom Ltd, England.

3. การแบ่งกลุ่มการทดลอง (Experimental design)

3.1 กลุ่มที่ 1 การทดลองหาขนาดของสารสกัดกระเทียม

ใช้หนูแรทพันธุ์ วิสตาร์ เพศผู้โตเต็มวัยอายุ 6-7 สัปดาห์ น้ำหนัก 225-250 กรัมจำนวน 60 ตัว ทำการป้อนสารสกัดกระเทียมทุกวันเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยป้อนเวลา 7.00-8.00 น. ซึ่งมีการแบ่งกลุ่มการทดลองตามขนาดของสารสกัดกระเทียม โดยใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 15 ตัว ดังต่อไปนี้

1. กลุ่ม ควบคุม ทำการป้อนด้วย normal saline จำนวน 2.5 มิลลิลิตร
2. กลุ่ม ทดลอง ทำการป้อนด้วยสารสกัดกระเทียมโดยการชั่ง oil ให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการจากนั้นนำไปผสมกับ normal saline เพื่อให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 2.5 มิลลิลิตร ซึ่งกลุ่ม ทดลอง ก็ได้มีการแบ่งกลุ่มตามปริมาณของสารสกัดกระเทียม ดังต่อไปนี้

2.1 กลุ่ม ทดลอง ด้วยสารสกัดกระเทียม 80 มก/กก.

2.2 กลุ่ม ทดลอง ด้วยสารสกัดกระเทียม 160 มก/กก.

2.3 กลุ่ม ทดลอง ด้วยสารสกัดกระเทียม 320 มก/กก.

จากนั้นนำหนูทุกตัวมาเจาะเลือด ก่อนเจาะเลือดต้องทำการอดอาหารและน้ำเป็นเวลา 12 ชัวโมง เพื่อนำเลือดบางส่วนไปหาระดับ โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ HDL และ LDL รวมทั้งระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน โดยเจาะวันที่ 10 (D_{10}), วันที่ 20 (D_{20}) และ วันที่ 30 (D_{30}) ที่เวลาเดียวกัน คือ 06.00-07.00 น. เมื่อเจาะเลือดครบ 30 วัน แล้วจึงฆ่าหนู เพื่อนำเอา Cauda epididymis มาศึกษาดูคุณภาพของตัวอสุจิต่อไป

3.2 กลุ่มที่ 2 การทดลองผลของสารสกัดกระเทียมต่อ fertility

ใช้หนูแรทเพศผู้จำนวน 30 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ทดลอง ด้วย normal saline จำนวน 2.5 มิลลิลิตร จำนวน 10 ตัว

กลุ่มที่ 2 ทดลอง ด้วยสารสกัดกระเทียมปริมาณ 160 มก/กก. จำนวน 10 ตัว

กลุ่มที่ 3 ทดลอง ด้วยสารสกัดกระเทียมปริมาณ 160 มก/กก. ร่วมกับการฉีดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ปริมาณ 50 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อขาทุกวัน ในการทดลองทั้ง 3 กลุ่มใช้เวลา 30 วัน เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 แต่ไม่ต้องมีการเจาะเลือด เมื่อครบกำหนดการทดลอง นำมาใส่กรงเดียวกับหนูตัวเมียโดยใส่หนึ่งตัวต่อหนึ่งตัว ในตอนบ่ายของวัน proestrus ในวันรุ่งขึ้นก็ตรวจดู sperm plug ที่ช่องคลอดถ้าพบว่ามี sperm plug ที่ช่องคลอดหนูตัวเมีย ถือว่าเป็นวันที่ 1 ของ pregnancy

3.3 การทดลองผลของสารสกัดกระเทียมต่อการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนใน Leydig's cell

ใช้หนูเมาส์เพศผู้ จำนวน 2 ตัว อายุ 24-25 วัน ทำการ sacrifice หนู เพื่อนำเอา testis ออกมา รวมแล้วจะได้จำนวน testis ทั้งหมด 2 คู่ จากนั้นนำ Leydig's cell มาแยกเซลล์ โดยตัดให้ละเอียด เพื่อให้ได้ Leydig's cell แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ M199 ที่มี 0.2 % BSA ร่วมกับสารสกัดกระเทียมในขนาด 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25,0.5 และ 1 มก. และเลี้ยงร่วมกับฮอร์โมน hCG (human chorionic gonadotrophin) ในขนาดต่าง ๆ คือ 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 IU ที่ต้องการทดสอบเพื่อดูการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนของ Leydig's cell ต่อไป

4. <u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

4.1 การเตรียมสารสกัดกระเทียม

สกัดสารจากกระเทียมโดยใช้วิธีของโรงงานเภสัชกรรมทหาร (2527) ดังนี้

4.1.1 นำกระเทียมสดแกะกลีบ แยกส่วนที่ฝอทิ้งไป นำไปล้างน้ำให้สะอาดและผึ่งให้แห้ง

4.1.2 นำกระเทียมที่แห้งแล้ว 100 กรัม ผสมรวมกับคลอโรฟอร์ม 120 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นนานจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

4.1.3 แยกส่วนกาก และตะกอนออก โดยการกรองด้วยผ้ากรองพับหนา 4 ทบ และกระดาษกรอง เบอร์ 1 ตามลำดับ

4.1.4 ระเหยไล่คลอโรฟอร์มออกโดยวิธี Rota vaporization ที่อุณหภูมิ 55°C จะได้ crude oil สีเหลืองเข้มออกมา

4.1.5 การทดสอบความบริสุทธิ์ของ crude oil ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน diallyl disulfide โดยใช้แผ่นกระจกขนาด 24 X 4.5 X 0.5 เซนติเมตร ฉาบด้วย Silica Gel 60 Gf 254 และใช้ Solvent System ที่ประกอบด้วย methanol:chloroform (3:1) เป็นตัวชะ ใช้ UV detector ตรวจสอบหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสาร พบว่าสารสกัดกระเทียมเคลื่อนที่ได้ระยะทาง มี R_f เท่ากับ 0.74 ซึ่งเท่ากับ diallyl disulfide จากนั้นนำ crude oil มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน diallyl disulfide อีกครั้งด้วยวิธี Head space Gas-Chromatographic analysis (GC) ภายใต้สภาพเดียวกันตลอด พบว่าได้ค่า retention time ของ peak เท่ากับ 4.73 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณของ diallyl disulfide พบว่ามีปริมาณของสาร diallyl disulfide อยู่ร้อยละ 70

4.1.6 สารสกัดที่ได้นี้เป็นสารอัลลิซิน และเพื่อให้คงสภาพอยู่ได้นานเติม povidone (PVPK 30) เพื่อทำหน้าที่เป็น preservatives การเก็บรักษาโดยวิธีนี้สารสกัด อัลลิซินจะมีความคงตัวประมาณ 1 ปี และการสกัดโดยใช้คลอโรฟอร์ม จะได้อัลลิซินประมาณ 0.06 % ของน้ำหนักกระเทียม (โรงงานเภสัชกรรมทหาร, 2527)

4.2 การตรวจ estrous cycle

ใช้หนูขาวเพศเมียอายุ 2-4 เดือน ที่มี estrous cycle ปกติติดต่อกันอย่างน้อย 3 cycle โดยการตรวจ Vaginal smear ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Long & Evan (1922) ใช้แท่งแก้วปลายมนทำความสะอาดด้วย 70 % อัลกอฮอล์แล้วจุ่มใน 0.85% NaCl สอดเข้าภายในช่องคลอด ใช้ปลายแท่งแก้วแตะ

กับผนังช่องคลอดเบาๆ แล้วเอาออกมาแตะบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศ์ ว่าเป็นเซลล์ชนิดใดและบันทึกผล ซึ่งช่วงที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์คือช่วง proestrus เซลล์ที่ได้จะเป็น nucleatd cell

4.3 การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดหนูโดยวิธีเจาะจากหัวใจ (cardiac puncture)ใช้ ether เป็นยาสลบ เจาะครั้งละ 2 มิลลิลิตรใช้ syringe ขนาด 2 มิลลิลิตร และเข็มเบอร์ 27 เจาะระหว่างช่วงเวลา 06.00-07.00 น. โดยเจาะที่ D_{10}, D_{20} และ D_{30} เลือดที่ได้แต่ละครั้งจะแบ่งออก 2 ส่วน เก็บใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยนำส่วนหนึ่งไปปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ใช้ pasteur pipett ดูดเอาซีรัมเพื่อนำไปหาโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ HDL และ LDL ต่อไป ส่วนเลือดที่เหลือนำไปเก็บไว้ 1 คืนที่ 4 °C จากนั้นนำไปปั่นที่ 2500 รอบต่อนาทีที่ 4 °C นาน 30 นาที แยกเก็บซีรัมไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปหาระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนต่อไป

4.4 การวิเคราะห์หาระดับ โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ HDL และ LDL

4.4.1 การวิเคราะห์หา โคเลสเตอรอล ใช้วิธี cholesterol liquicolor enzymatic colourimetric test for kinetic determination ตามวิธีของ Allain, Poon and Chan (1974)

ดูดซีรัมหรือ สารมาตรฐานของโคเลสเตอรอล ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสาร reagent 1 มล. จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง mixer ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำมาเติมสารละลาย dextrose 1 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องอีกครั้ง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนของแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยการวัดค่า OD ที่ 500 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่วัดได้มาหาค่าโคเลสเตอรอล มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/เดซิลิตร โดยหาได้จากสูตร

$$\text{mg (cholesterol)} = \frac{\text{Absorbant (sample)}}{\text{Absorbant (standard)}} \times 200$$

4.4.2 การหาระดับ ไตรกลีเซอไรด์ ใช้วิธี fully enzymatic colourimetric test ตามวิธีของ Megraw, Dunn and Biggs (1979)

ดูดซีรัมหรือ สารมาตรฐานของไตรกลีเซอไรด์ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสาร reagent 1 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่อง mixer ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีนำมาเติมสารละลาย dextrose 1 มล. เขย่าอีกครั้งด้วยเครื่อง mixer จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนของแสงด้วยเครื่อง spectophotometer โดยการวัดค่า OD ที่ 500 นาโนเมตรจากนั้นนำไปคำนวณหาค่าไตรกลีเซอไรด์ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/เดซิลิตร จากสูตร

$$\text{mg (Triglyceride)} = \frac{\text{Absorbant (sample)}}{\text{Absorbant (standard)}} \times 200$$

4.4.3 การหาระดับ HDL ใช้หลัก chemical precipitation techniquesตามวิธีของ Lopes-Virella et al., (1977)

ดูดซีรัมปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำมาเติมสาร HDL reagent 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง mixer ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 4000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวใสมา 100 ไมโครลิตร เมื่อถึงขั้นตอนนี้ก็จะทำไปพร้อม ๆ กับการทำ standard คือดูดสารมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร ผสมกับสาร cholesterol reagent 1 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่อง mixer ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำไปเติมสารละลาย dextrose 1 มล. นำไปเขย่าอีกครั้งด้วยเครื่อง mixer แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนของแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD 500 นาโนเมตร แล้วนำไปหาค่า HDL จากสูตร มีหน่วยเป็น มก/เดซิลิตร

$$\text{mg (HDL)} = \frac{\text{Absorbant (sample)}}{\text{Absorbant (standard)}} \times 175$$

4.4.4 การหาระดับ LDL ใช้วิธีคำนวณค่า โคเลสเตอรอล ชนิดต่างๆ แล้วนำมา คำนวนตามสูตรของ Friedewald, Levy and Fredrickson (1972)

$$mg\ (LDL) = Total\ cholesterol - HDL - \frac{Triglyceride}{5}$$

4.5 การวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

4.5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับ RIA Assay buffer

ละลาย gelatin 1.00 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มล. โดยอุ่นให้ gelatin ละลายจนหมด ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	2.35 กรัม
disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	11.60 กรัม
sodium chloride	8.80 กรัม
thimersal	0.10 กรัม

คนให้ละลายจนหมดแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับ PH ให้ได้ 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ใช้ได้นาน 1 เดือน

Charcoal Suspension

ละลาย dextran 0.0625 กรัม ใน assay buffer 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม charcoal 0.625 กรัม เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาทีเก็บไว้ที่ 4 °C ได้นาน 1 เดือน เมื่อจะใช้ต้องนำไปกวนที่อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลาที่ใช้

Scintillation fluid

toluene	1000 มิลลิลิตร
PPO	5 กรัม
dimethyl Popop	0.3 กรัม
dioxane	200 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลควรผสมทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

การเตรียม Testosterone working tracer

จาก (1,2,6,7,^{3}H) testosterone ชึ่งละลายอยู่ใน benzene:ethanol ในอัตราส่วน 9:1 เป็น testosterone stock tracer ที่มีความแรง 5 ไมโครคูรี่/มล. นำมาเจือจางให้ได้ 100 นาโนคูรี่/มล. ด้วยการนำ testosterone stock tracer จำนวน 1 มล. เปาให้แห้งด้วย compressor air แล้วจึงเติม assay buffer 50 มล. ผสมให้เข้ากันจะได้ testosterone working tracer ที่มีความแรง 100 นาโนคูรี่/มล. เก็บไว้ที่ 4 °C เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

การเตรียม Testosterone antisera

Testosterone antisera จาก WHO ชึ่งอยู่ในสภาพที่ถูกทำให้แห้ง (lyophilized) นำมาเติม assay buffer 10 มล. เขย่าให้ละลายจนหมด เตรียมแล้วใช้ได้ทันที เก็บไว้ที่ 4 °C เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ ภายหลังจากที่เติมลงในหลอดทดลองแล้ว(100 ไมโครลิตร) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:210,000

การเตรียม Testosterone standard

เตรียมโดยใช้สารมาตรฐานเทสโทสเตอโรนจาก WHO ที่มีความเข้มข้น 220 นาโนโมลต่อลิตร ดูดสารมาตรฐานมา 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลาย assay buffer 10 มล. mix เบาๆ แล้วนำไป heat ที่ 40 °C นาน 40 นาที จะได้ความเข้มข้น 2.2 พิโคโมลต่อลิตร (stock solution) นำ stock solution มา 2 มล. นำมาทำ serial dilution ดังตาราง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงการเตรียมสารมาตรฐานเทสโทสเตอโรน

ลำดับที่	ความเข้มข้น	ปริมาตร มิลลิลิตร	assay buffer มิลลิลิตร	ความเข้มข้นที่ได้ (fmol/0.5มิลลิลิตร)
1	stock sol^{n}	2	-	1100
2	1	2	2	550
3	2	2	2	275
4	3	2	2	138
5	4	2	2	69
6	5	2	2	34
7	6	2	2	17

4.5.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรน โดยวิธี RIA

การสกัดเทสโทสเตอโรนด้วย อีเธอร์

1) ดูดซีรัม 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate)

2) เติมอีเธอร์หลอดละ 5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานหลอดละ 1 นาที

3) ทำการแยกชั้น โดยนำหลอดทดลองที่อยู่ใน test tube rack วางบนถาดน้ำแข็งแห้ง ผสมกับ 95% ethanol ชั้นล่างของหลอดทดลองจะแข็งตัว ชั้นบนจะเป็นส่วนของฮอร์โมนที่ถูกสกัดออกมาด้วยอีเธอร์ เทส่วนบนลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง

4) นำหลอดทดลองชุดใหม่ไปทำให้อีเธอร์ระเหยออกไป ด้วยการทำให้แห้ง โดยนำไปใส่ไว้ใน dry-block heater ที่อุณหภูมิ 30-40 °C นาน 1 ชั่วโมง

5) นำหลอดทดลองดังกล่าว มาเติม assay buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานหลอดละ 1 นาที เพื่อให้ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดออกมาละลายอยู่ใน buffer ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งนานหลอดละ 1 นาที

6) ดูด tracer 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน

7) ดูด antibody 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้ากัน incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 18-20 ชั่วโมง

8) ดูด tracer 50 ไมโครลิตร แล้วเติม pool serum 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง 3 หลอดนำไปเติม ether 5 มิลลิลิตร ทำการแยกชั้นโดยวางบนถาดน้ำแข็งแห้ง เพื่อให้ส่วนของฮอร์โมนถูกสกัดออกมาอยู่ในชั้นของ ether เมื่อนำไป heat จนแห้งแล้วจึงนำไปปิเปตใส่หลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง 250 ไมโครลิตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ recovery

9) ดูด tracer 50 ไมโครลิตร ใส่ counting vial นำมาเติม buffer 500 ไมโครลิตร จำนวน 3 vial เพื่อหา total count recovery

การแยก free form และ bound form ด้วย charcoal suspension

1) ดูด charcoal suspension 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดเขย่าให้เข้าเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที

2) นำไปปั่นแยกเอาส่วน free form ที่จับอยู่กับ charcoal suspension ออกที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที

3) เทส่วนที่เป็น bound form ใส่ใน counting vial เติม scintillation fluid หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวัดระดับฮอร์โมนด้วยเครื่อง Beta-liquid scintillation counter นานหลอดละ 5 นาที

ขั้นตอนการวัดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แสดงได้ด้วยตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 แสดงขั้นตอนการวัดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

หลอดทดลอง	Assay buffer ul	Tracer ul	Ab ul		charcoal suspension
TC	600	100	-	ทิ้งไว้ที่	-
NSB	600	100	-	4 องศา	200
TBo	500	100	100	เซลเซียส	200
sample or std	500	100	100	1 คืน	200

* หมายเหตุ

TC = Total count

NSB = Non specific binding

TB_o = Maximum binding

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณผลทาง RIA

กราฟมาตรฐาน

นำค่า cpm ของ standard แต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้วลบออกด้วย NSB (X-NSB) นำแต่ละค่าไปคำนวณหา ค่า cpm แล้วนำไป plot กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็นเฟมโตโมล/หลอด บนกระดาษกราฟกึ่งล็อก (semilog)

ตัวอย่างซีรัม

นำค่า cpm ของแต่ละตัวอย่างซีรัม ซึ่งเป็น duplicate มาหาค่าเฉลี่ยลบออกด้วย NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานได้ค่าเป็นพิโคโมล/มิลลิ

% recovery คำนวนได้จาก

(ค่าเฉลี่ย cpm ของ RCE) X 100

(ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR)

4.5.3 การประเมินความเชื่อถือได้ของ RIA

ตามวิธีการของ Ekins (1970) และ Abraham (1974) ดังนี้คือ

ความจำเพาะ

ความจำเพาะของ RIA หมายถึงความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนหรือฮอร์โมน แอนติบอดีย์ที่ได้จากการฉีดแอนติเจน กระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดี จะเป็นแบบ polyclonal ดังนั้นมักจะมีปฏิกริยากับสารอื่นในทางปฏิบัติ จะทำการทดสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีย์กับสารอื่น ที่มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ เรียกปฏิกิริยาการทดสอบนี้ว่า cross reaction คำนวณได้จาก

% cross reaction

= ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีย์ได้50 X 100
ปริมาณของสารมาตรฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีย์ที่ 50 %

แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองได้จากองค์การอนามัยโลก (Sufi, Donaldson and Jeffcoate, 1990) ซึ่งทดสอบ % cross reaction ได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี เทสโทสเตอโรน ที่ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ

สาร	% cross reaction
Testosterone	100
Cortisol	0.0001
5α-Dihydrotesterone	14
Δ 4 -Androstenedione	1.8
5α-Androstanediol	6
Δ 5 -Androstenediol	2.1

ความแม่นยำ

หมายถึง ความสามารถในการวิเคราะห์สารแต่ละครั้งได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งจะทดสอบความแม่นยำ โดยทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสามระดับ คือ ความเข้มข้นระดับต่ำ กลางและสูงชนิดละ 10 ตัวอย่างแล้วคำนวณหาความแม่นยำของการวิเคราะห์แต่ละระดับความเข้มข้น โดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความแม่นยำของการวัด ด้วยการวิเคราะห์ฮอร์โมนที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ ความเข้มข้นภายใน assay ชุดเดียวกัน (intra-assay) อย่าง ละ 10 ตัวอย่าง และต่างชุดกันหรือระหว่างชุด (inter-assay) ของการทดลอง 3 ครั้งได้ผลดังนี้

ตารางที่ 4 แสดง % CV ของความแม่นยำทั้ง intra-inter assay และความไว ของฮอร์โมน

สารควบคุมคุณภาพ	intra – assay		inter-assay		% ความไว fmol/ml
	$\overline{X} \pm SD$	% CV	$\overline{X} \pm SD$	%CV	
ต่ำ	2403.3 ± 98.8	4.1			
กลาง	1816.8 ± 96.4	5.3	294.6 ± 14.9	5.1	13.1 ± 1.6
สูง	1051.6 ± 119.3	11.4			

ความถูกต้อง

ความถูกต้องของการวิเคราะห์หาได้จากการนำซีรัม ที่ทราบปริมาณฮอร์โมนทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนในซีรัมตามขั้นตอน แล้วเทียบกับปริมาณฮอร์โมนที่แท้จริงคิดออกมาเป็นเปอร์เซนต์ ก็จะทราบเปอร์เซนต์ความถูกต้องของการวิเคราะห์

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนจริง}} \times 100$$

ทำโดยดูดฮอร์โมนมาตรฐานเทสโทสเตอโรนทั้ง 3 ค่า คือ สูง กลาง ต่ำ ใส่ลงในซีรัม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วสกัดด้วยอีเธอร์ 5 มิลลิลิตร นาน 1 นาที นำไปผ่านขบวนการทาง RIA ซึ่งทำการตรวจวัดความถูกต้อง ของการวัดฮอร์โมนแต่ละครั้งๆละ 10 ตัวอย่างของการทดลอง 3 ครั้ง ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงความถูกต้องของการวัดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

สารควบคุมคุณภาพ	ค่าจริง fmol/มิลลิลิตร	ค่าที่วัดได้ fmol/มิลลิลิตร	% ความถูกต้อง fmol/มิลลิลิตร
ต่ำ	69	84	121.7
กลาง	275	292	106.18
สูง	1066	1020	95.68

ความไวของการวิเคราะห์

ความไวของการวิเคราะห์หมายถึง ค่าที่น้อยที่สุดของฮอร์โมนที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ทำได้โดยการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าเฉลี่ย cpm จากจุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (B_o) ลบด้วย 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดนี้นำค่า cpm นี้ไปคำนวณหาค่า B/B_oX100 แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐาน จะได้ค่าความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Abraham, 1974) จากการหาความไวของวิธีการวิเคราะห์นี้ได้ทำซ้ำ 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยจากผลที่ได้ ความไวของการวิเคราะห์หาฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ดังตารางที่ 4

4.6 การวิเคราะห์คุณภาพของตัวอสุจิ

4.6.1 สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาคุณภาพของตัวอสุจิ

การเตรียมสารละลาย Baker`s solution

Glucose	3	กรัม
Na_2HPO_4	0.668	กรัม
NaCl	0.20	กรัม
KH_2PO_4	0.03	กรัม

นำสารละลายทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 °C (ก่อนใช้ต้องทำให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง)

4.6.2 การเตรียมสารละลาย Sperm counting dilution solution

$NaHCO_3$	25	กรัม
Formalin	5	มล.

นำ $NaHCO_3$ ละลายใน Formalin แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 °C (ก่อนใช้ต้องทำให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง)

4.6.3 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพของตัวอสุจิ

ก. การวิเคราะห์ความหนาแน่นและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (sperm count and sperm motility) ตามวิธีของ Lamano-Cavalho and Kempinas (1987) และ เอนก อารีพรรค และคณะ (2531)

ทำการ sacrifice หนูเมื่อทดลองครบ 30 วัน ผ่าเปิดช่องเชิงกราน นำส่วนของ cauda epididymis ล้างใน 0.9 % NaCl แล้วนำไปใส่ในจานแก้วที่สะอาด ทำการตัดออกเป็น 3 ส่วนและใช้เข็ม sterile จิ้มเพื่อให้น้ำอสุจิออกมา ใช้ micro pipette pipett ดูดน้ำอสุจิมา 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้วที่มี น้ำยา Baker 1 มล. โดยควบคุมอุณหภูมิ 35 °C เพื่อปล่อยให้ตัวอสุจิว่ายออกมาทั่วสารละลายนั้น ตั้งทิ้งไว้ 1-2 นาที แล้วนำมาดูการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

โดยใช้ micropipette ดูดน้ำอสุจิมา 10 ไมโครลิตร ใส่บนแผ่น slide ที่สะอาด แล้วใช้แผ่น cover glass แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (กำหนดการเคลื่อนเป็นแบบ progressive หรือ non-progressive) หลังจากนั้นทำการนับจำนวนตัวอสุจิ โดยนำน้ำอสุจิมา 10 ไมโครลิตร ใส่ใน น้ำยา sperm counting dilution solution จำนวน 1 มล. เพื่อให้ตัวอสุจิตายแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง mixer เพื่อให้กระจายความหนาแน่นเท่ากัน แล้วใช้micropipett ดูดมา 10 ไมโครลิตร เพื่อนำไปนับจำนวนด้วยเครื่อง haemocytometer โดยนับ 25 ช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ แล้วหาค่าเฉลี่ยทั้ง 2 ช่วงคือ บน และล่าง จะได้จำนวนตัวอสุจิ X 10^6 ตัว/ปริมาตรน้ำอสุจิ

ข. การวิเคราะห์จำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตต่อจำนวนตัวอสุจิที่ตาย (sperm viability) ตามวิธีของ Lamano-Carvalho et al, (1987) และ เอนกอารีพรรค และคณะ (2531)

ใช้วิธีของ supra vital staining method โดยหยดน้ำอสุจิซึ่งละลายอยู่ในBaker's solution จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม แล้วตามด้วย 1 % eosin Y 1 หยด ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วหยด 10% nigrosin 2 หยด คนให้เข้ากันจากนั้นใช้ micropipette ดูดมา 10 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบนแผ่น slide ที่สะอาดแล้วใช้ cover glass เกลี่ยลากให้ถึงปลาย slide ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับให้ครบ 100 ตัว โดยนับทั้งตัวเป็นตัวตาย แยกได้โดยสังเกตที่ตัวตายจะติดสีแดงของสาร eosin Y เนื่องจากผนังเซลล์ตายจะทำให้ดูดสารสีแดงของ eosin Y ส่วน nigrosin จะช่วยให้พื้นของสี slide เข้มขึ้น

4.7 ผลของสารสกัดกระเทียมต่อการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนใน Leydig's cell

4.7.1 การเตรียมอาหารเลี้ยง Leydig's cell

ละลาย M199	0.992 กรัม
HEPES	0.596 กรัม
โซเดียมไบคาร์บอเนต	0.035 กรัม

สารละลายเพนนิซิลิน-สเตรพโตมัยซิน 1 มิลลิลิตร

ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่าน Millipore ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่ 4 °C ทุกครั้งที่ใช้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาเติม 0.2% BSA.

4.7.2 การเตรียม Leydig's cell

ใช้หนูไมซ์พันธุ์สวิสเพศผู้อายุ 24 วัน 2 ตัว เปิดหน้าท้องหนูด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบดึงเอาอัณฑะออกมาจากถุงอัณฑะไปล้างใน M199 ที่มี 0.2 % BSA 1 มล. ใน culture dish (60X15 mm) ที่วางอยู่บนกระบะน้ำแข็ง เจาะเยื่อบาง ๆ ที่หุ้มถุงอัณฑะด้วยกรรไกรที่ปลอดเชื้อ และใช้เข็มเขี่ยกลุ่มเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในถุงอัณฑะ ออกจนหมดลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ตัดกลุ่มเนื้อเยื่อเหล่านี้จนละเอียด แล้วนำไปใส่ในบีคเกอร์ที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 24 มล. นำไปกวนที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เพื่อให้ seminiferous tubules กระจายออกทั่วกันจากนั้นนำ pasteur pipett ดูดกลุ่มเนื้อเยื่อขึ้นลง 150 ครั้ง ซึ่งช่วยให้เซลล์แยกตัวได้ดีขึ้น แล้วกรองด้วยผ้าก๊อซที่ปลอดเชื้อ ลงใน flask ขนาด 50 มล. แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงใน Dubnoff Metabolic Shaker Incubator ที่อุณหภูมิ 34 °C เขย่า 60 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนที่เป็นsupernatant ทิ้งไป นำกลุ่มเซลล์ไปทำให้กระจายอีกครั้งด้วย M199 ที่มี 0.2% BSA อยู่ 16 มล. นำเซลล์ที่ได้ไปนับหาจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ Hemocytometer และตรวจหาเปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดด้วยการหยด 0.1 % trypan blue 1 หยด และ cell suspension 1 หยด ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จึงนำไปตรวจนับเซลล์ที่ติดสีและไม่ติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน เซลล์ที่เตรียมได้มีจำนวน 6 X 10^5 เซลล์ ต่อ 16 มล. ซึ่งเป็นเซลล์ที่เตรียมได้ โดยที่ยังไม่ได้ dilute จะมีปริมาตรทั้งหมด 16 มล. และมีอัตราการมีชีวิตรอดมากกว่า 90% แล้วนำเซลล์ที่เตรียมไว้นี้ไปทดลองต่อไป

4.7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรนใน Leydig's cell ด้วยวิธี RIA

1) นำเซลล์ ที่เตรียมได้จากขั้นตอนการเตรียม Leydig cell จำนวน 16 มล. มาเติม M199 ที่มี 0.2 % BSA อีก 16 มล. จะได้ปริมาตรทั้งหมด 32 มล. จากนั้นดูดใส่ในหลอด ทดลองตาม protocol หลอดละ 100 ไมโครลิตร ในขณะที่เซลล์ที่เตรียมอยู่ในถาดน้ำแข็งและมีการกวนตลอดเวลา

2) ดูดสารสะกัดกระเทียม หรือฮอร์โมน HCG ลงในหลอดทดลองที่มีเซลล์อาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ จำนวน 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตร

3) นำหลอดทดลองทั้งหมดไป incubate ที่ 34 °C นาน 2 ชั่วโมง ใน Dubnoff Metabolic Shaker

4) หยุดปฏิกริยาด้วยการวางบนถาดน้ำแข็ง จากนั้นนำมาสกัดฮอร์โมนด้วยการเติมether จำนวน 5 มล. ทุกหลอด ใช้ฝาปิดหลอดทดลองทุกหลอดแล้วคว่ำหงายด้วย rack นาน 3 นาที

5) นำหลอดทดลองไปปั่นที่ 2500 รอบต่อนาทีที่ 4 °C นาน 15 นาที เพื่อให้ Leydig's cell ตกตะกอน ซึ่งฮอร์โมนจะถูกสกัดอยู่ในชั้นของ ether

6) แยกชั้นของ diethyl ether ด้วยน้ำแข็งแห้ง รินส่วนใสที่เป็น ether ลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง นำไป dry ให้แห้งด้วยเครื่อง heat incubator ที่อุณหภูมิ 40 °C

7) นำหลอดที่แห้งแล้วมาเติม สาร tracer และ antibody ของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนการหาฮอร์โมนด้วยวิธี RIA ต่อไป

5. <u>การแปลผลทางสถิติ</u>

ปริมาณของฮอร์โมนที่วัดได้และค่าของปริมาณ โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ LDLHDL ตลอดจนข้อมูลทาง คุณภาพของตัวอสุจิ จะนำมาตรวจวัดหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ ANOVA ชนิด one way analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างเป็นคู่โดยใช้ Duncan's Multiple range test โดยมีระดับความเชื่อมั่นที่ $P<0.05$ หรือ $P<0.01$