บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

หนูไมซ์ตัวผู้น้ำหนักระหว่าง 18-20 กรัม จากกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย

2. พิษงู

พิษงูจงอางจากกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ในรูปของผลึกที่ถูก lyophilized แล้ว มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน เป็นพิษที่ได้จากงูจงอาง Ophiophagus hannah พิษงูที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นพิษที่ได้จากการสกัดครั้งเดียว ซึ่งจะมีความเป็นพิษเท่ากันหมด

พิษงูจงอางถูกเก็บรักษาไว้ในภาชนะกันความชื้น(desiccator) ที่อุณหภูมิประมาณ 4 °C

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การให้พิษงู

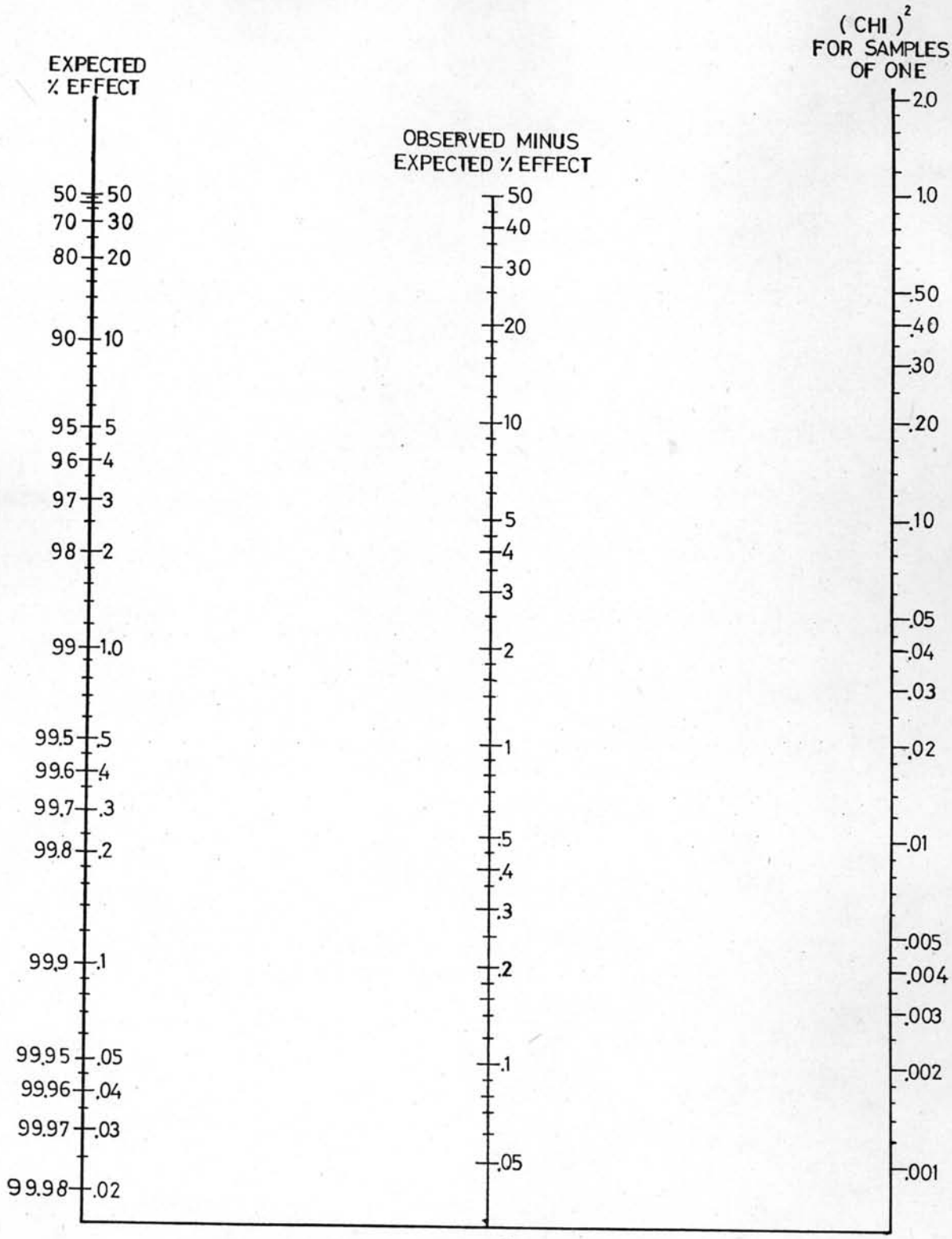
ชั่งและละลายพิษงูจงอางใน normal saline (0.87% โซเดียมคลอไรด์) ให้พิษงูโดยฉีดเข้าทางช่องท้องของสัตว์ทดลอง

2. การหา LD_{50} ของพิษงูจงอางในหนูไมซ์

เนื่องจาก lethal dose ของพิษงูที่มีต่อสัตว์ทดลองเป็นค่าที่เปลี่ยนแปลงได้บ้างเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับพิษงูที่สกัดได้ในแต่ละครั้ง อย่างเช่นค่า LD_{50} ของพิษงูจงอางที่ฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูไมซ์ มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านหาค่า

ได้แตกต่างกันดังนี้ 1.28 ม.ก./ก.ก.(Ganthavon, 1969), 1.6 ม.ก./ก.ก. (Kocholaty et al , 1971) และ 2.0 ม.ก./ก.ก.(Lee, 1971) การทดลองครั้งนี้ได้เริ่มจากการหา LD_{50} ของพิษงูจงอางที่ได้จากสถานเสาวภา ต่อหนูไมซ์โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง ด้วยวิธีของ Litchfield และ Wilcoxan (1949) โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 8 ตัว ฉีดพิษงูเข้าทางช่องท้องตามปริมาณต่างๆกันในแต่ละกลุ่มคือ 1.2 , 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 และ 2.2 ม.ก./ก.ก. น้ำหนักตัว หลังจากนั้น 24 ช.ม. นับจำนวนของสัตว์ทดลองที่ตายในแต่ละกลุ่ม นำมาคำนวนคิดเป็นเปอร์เซนต์ของสัตว์ทดลองที่ตาย (observed % death). นำค่าที่ได้นี้ไปเขียนลงบนกระดาษ logarithmic-probability graph. จากนั้นอ่านค่าเปอร์เซนต์ที่คาดว่าตาย (expected % death) จากเส้นที่ลากขึ้นบนกราฟนี้. ทำ $(Chi)^2$ test โดยเอาค่าเปอร์เซนต์ที่ตายจริงลบด้วยเปอร์เซนต์ที่คาดว่าจะตายที่อ่านได้ในแต่ละกลุ่ม จะได้ค่าตัวเลขต่างๆออกมา 6 ค่าจากสัตว์ทดลองทั้งหมด 6 กลุ่ม นำค่าที่ได้นี้ไปทำให้เป็น $(Chi)^2$ โดยอ่านเทียบกับเปอร์เซนต์ที่คาดว่าตายจาก monograph (หน้าที่ 18) ตัวเลขทั้งหมดสรุปได้เป็นตารางดังนี้

Dose (mg/kg)	Death per tested	Observed % death	Expected % death	Observed minus Expected	Contribution to $(Chi)^2$
2.2	8/8	100.00(93.0)	94.00	6.00	0.065
2.0	6/8	75.00	86.00	11.00	0.10
1.8	6/8	75.00	72.50	2.50	0.003
1.6	3/8	37.50	50.00	12.50	0.064
1.4	3/8	37.50	26.00	11.50	0.066
1.2	1/8	12.50	8.00	4.50	0.326
				รวม	0.524



Nomograph for obtaining (Chi)² from Expected % Effect - and Observed - Expect % Effect

(After Litchfield and Wilcoxon , 1949)

เอาผลบวกของ $(Chi)^2$ ทั้งหมดคูณด้วยจำนวนสัตว์ทดลองในหนึ่งกลุ่ม เท่ากับ 0.324 x 8 = 2.592 จำนวนของ dose (k) เท่ากับ 6 ชั้นแห่งความอิสระ (degree of freedom), n เท่ากับ k - 2 = 6 - 2 = 4

จากตารางที่ 2 อ่านค่าชั้นแห่งความอิสระเท่ากับ 4 เทียบเป็น $(Chi)^2$ เท่ากับ 9.49 ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าค่าที่หาได้คือ 2.592 แสดงว่าเส้นกราฟที่ลากขึ้นนี้ มีการปรับสารูปภาวะสนิทดี (goodness of fit)

ตารางที่ 2 Values of $(Chi)^2$ for p = 0.05

Degree of freedom	$(Chi)^2$
1	3.84
2	5.99
3	7.82
4	9.49
5	11.10
6	13.60
7	14.10
8	15.50
9	16.90
10	18.30

อ่านค่า LD_{50} จากกราฟ

3. การจัดกลุ่มสัตว์ทดลอง

ในการทดลองได้แบ่งหนูไมซ์ออกเป็น 2 พวกๆละ 4 กลุ่มดังนี้

3.1 พวกได้รับพิษงูครั้งเดียว (Single dose)

แบ่งหนูไมซ์ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามปริมาณของพิษงูที่ได้รับดังนี้

กลุ่ม A ได้รับพิษงูในปริมาณ LD_{50} จำนวน 8 ตัว

กลุ่ม B ได้รับพิษงูในปริมาณ 3/4 LD_{50} จำนวน 8 ตัว

กลุ่ม C ได้รับพิษงูในปริมาณ 1/2 LD_{50} จำนวน 8 ตัว

กลุ่ม D กลุ่มควบคุม (control) จำนวน 24 ตัว

หลังจากฉีดพิษงู 2 ชั่วโมง ฆ่าและตัดเอาส่วนของตับ ไต หัวใจ และสมองส่วนหลังมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีทางฮีสโตเคมี และศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

3.2 พวกที่ได้รับพิษงูหลายครั้ง (Repeated does)

แบ่งหนูไมซ์ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามปริมาณของพิษงูที่ได้รับดังนี้

กลุ่ม A ได้รับพิษงูในปริมาณ 1/2 LD_{50} จำนวน 8 ตัว

กลุ่ม B ได้รับพิษงูในปริมาณ 1/3 LD_{50} จำนวน 8 ตัว

กลุ่ม C ได้รับพิษงูในปริมาณ 1/4 LD_{50} จำนวน 8 ตัว

กลุ่ม D กลุ่มควบคุม จำนวน 24 ตัว

ฉีดพิษงูตามปริมาณข้างต้น ตัวละ 4 ครั้ง วันเว้นวัน และฆ่าในวันที่ 8 หลังจากฉีดครั้งสุดท้าย 1 วัน ตัดเอาส่วนของตับ ไต หัวใจ และสมองส่วนหลังมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีทางฮีสโตเคมี และศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

4. วิธีการฆ่าสัตว์ทดลอง

ฆ่าโดยวิธีดึงคอ แล้วใช้กรรไกรปลายตรงเปิดช่องท้อง ตัดเอาส่วนตับ

และไตข้างขวา แล้วใช้กรรไกรปลายตรงเปิดช่องอก แบ่งครึ่งหัวใจตามขวาง ตัดเอาหัวใจครึ่งบน ซึ่งประกอบด้วยส่วนของเอเทรียมและเวนทริคัลส่วนบนไว้ จากนั้นใช้คีมตัดกระดูกเปิดกระโหลก แล้วตัดเอาสมองส่วนหลังทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยส่วนของซีรีเบลลัม (cerebellum) และเมดดูลาออบลองกาตา (medulla oblongata). นำเอาเนื้อเยื่อทั้งหมดนี้มาศึกษาทางฮีสโตเคมี จากนั้นตัดตับ ไตข้างซ้าย และหัวใจครึ่งล่างมาแช่ในน้ำยาโบแอง (Bouin's fluid) เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

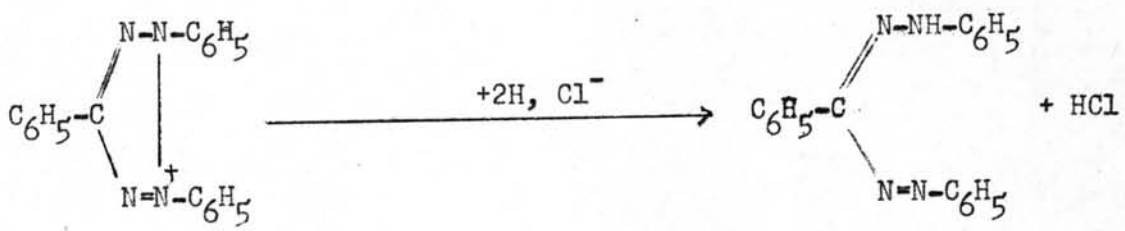
5. วิธีการศึกษาเอนไซม์

5.1 การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ซักซินิกดีไฮโดรจีเนส

นำเนื้อเยื่อของตับ ไตข้างขวา หัวใจครึ่งบน และสมองส่วนหลัง หุ้มด้วยไครโอฟอร์ม (cryoform). แล้วทำให้เย็นจนแข็งทันที ด้วยน้ำแข็งแห้งหรือไนโตรเจนเหลว ใช้เครื่อง cryostat ตัดชิ้นเนื้อเยื่อหนา 8 ไมครอน ติดชิ้นเนื้อเยื่อบนแผ่นคัพเวอร์กลาส (cover glass)

หลักการ

ใช้โซเดียมซักซิเนท (sodium succinate) เป็นซับเตรทของเอนไซม์ซักซินิกดีไฮโดรจีเนส ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ตัวนี้ ทำให้เกิดไฮโดรเจนอิออน ซึ่งจะถูกส่งให้ตัวรับไฮโดรเจนหรืออิเลกตรอน คือ nitro blue tetrazolium salt (nitro-BT). Nitro - BT ที่อยู่ในสภาพปกติของ tetrazolium salts จะไม่มีสี แต่เมื่อถูกรีดิวซ์โดยไฮโดรเจนทำให้เปลี่ยนสภาพเป็น diformasan ที่มีสีน้ำเงินเข้ม



Tetrazolium salt Formasan

วิธีการทดลอง (Nachlas et al, 1957)

1. แช่ชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนกลัสเวอร์กลาสลงในสารละลายซับเตรทที่ประกอบด้วย 10 ม.ล.ของสารละลายซัคซิเนท (เตรียมจาก 0.2โมล. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.6 และ 0.2 โมล.โซเดียมซัคซิเนท อย่างละเท่าๆกัน) รวมกับ 10 ม.ล.ของสารละลาย nitro-BT (1 ม.ก./ม.ล.) แช่ไว้เกิดปฏิกริยาใน watwr bath อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 นาที

2. ล้างชิ้นเนื้อเยื่อด้วย 0.87% โซเดียมคลอไรด์

3. Fix ชิ้นเนื้อเยื่อใน 10% ฟอร์เมอซาไลน์ (formal-saline) เป็นเวลา 10 นาที

4. Dehydrate ด้วย 15% เอทธิลแอลกอฮอล์เป็นเวลา 5 นาที

5. ติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ด้วยกลีเซอรีนเจลลี่ (glycerine jelly)

ชิ้นเนื้อเยื่อที่ใช้เปรียบเทียบปฏิกริยาจะแช่ในสารละลายที่ไม่มีซับเตรท (โซเดียมซัคซิเนท)

5.2 <u>การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์อะเซทธิลโคลินเอสเตอเรส</u>

นำเนื้อเยื่อของตับ ไตข้างขวา หัวใจซีกบน และสมองส่วนหลัง หุ้มด้วยไครโอฟอร์ม แล้วทำให้เย็นจนแข็งทันที ด้วยน้ำแข็งแห้งหรือไนโตรเจนเหลว เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ตัวนี้ค่อนข้างจะมีน้อย จำเป็นต้องตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้หนาเพียงพอที่จะศึกษาการทำงานของเอนไซม์ตัวนี้ จึงตัดชิ้นเนื้อเยื่อหนา 24 ไมครอน ด้วยเครื่อง cryostat ติดชิ้นเนื้อเยื่อบนแผ่นกลัสเวอร์กลาส

<u>หลักการ</u>

อะเซทธิลไทโอคอลีน ไอโอไดด์ (acetylthiocholine iodide) เป็นซับเตรทของเอนไซม์อะเซทธิลโคลินเอสเตอเรส และโคลินเอสเตอเรส ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์อะเซทธิลไทโอโคลิน ได้ในอัตราที่เร็วกว่าอะเซทธิลโคลินที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดตะกอนขาวของคอปเปอร์ไทโอโคลิน ซึ่งเมื่อทำปฏิกริยากับแอมโมเนียมซัลไฟด์

จะถูกเปลี่ยนเป็นสารอสัณฐานสีน้ำตาลของคอปเปอร์ธัลไฟด์ (Pearse, 1972,. Chayen, Bitensky และ Butchen., 1973) ตามปฏิกริยาดังนี้ (Harris, Cohen และ Bergner, 1953)

1. $2CH_3COSCH_2CH_2N(CH_3)_3OH$ + $(NH_2CH_2COO)_2Cu$ + $2H_2O$

(acetylthiocholine) (copper glycinate)

ACETYLCHOLINESTERASE

$CuSCH_2CH_2N(CH_3)_3OH_2$ + $2NH_2CH_2COOH$ + $2CH_3COOH$

(copper thiocholine) (glycine)

2. $CuSCH_2CH_2N(CH_3)_3OH_2 + (NH_4)_2S \longrightarrow CuS + 2NH_4SCH_2CH_2N(CH_3)_3OH$

(copper sulphide)

วิธีการทดลอง (Gormori, 1952)

1. แช่ชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์เวอร์กลาส ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วย 10 ม.ล.ของ stock solution (ประกอบด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต 0.3 กรัม ไกลซีน 0.375 กรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ 1 กรัม และกรดมาลิอิค 1.75 กรัม ละลายใน 4% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 ม.ล. และ 40% โซเดียมซัลเฟต 70 ม.ล.) รวมกับ 20 ม.ก.ของอะเซทธิลไทโอโคลีนไอโอไดด์ ที่ละลายในน้ำ 1 ม.ล. แช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2. ล้างชิ้นเนื้อเยื่อลงในโซเดียมซัลเฟตอิ่มตัว 3 ครั้ง

3. แช่ชิ้นเนื้อเยื่อลงใน 1% แอมโมเนียมซัลไฟด์เป็นเวลา 1 นาที

4. ล้างในน้ำกลั่น แล้วติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ด้วยกลีเซอลีนเจลลี

สำหรับเนื้อเยื่อที่ใช้เปรียบเทียบปฏิกริยา แช่ลงในสารละลายที่ไม่มีบัฟเฟอร์ (อะเซทธิลไทโอโคลีนไอโอไดด์)

6. การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

นำเนื้อเยื่อของตับ ไตข้างซ้าย และหัวใจครึ่งล่างที่ผ่านการรักษาสภาพเนื้อ

เยื่อในน้ำยาโบแองแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มา dehydrate ใน 70% เอทธิลแอลกอฮอล์ข้ามคืน แช่ใน 90% เอทธิลแอลกอฮอล์ 6 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนใน 95% เอทธิลแอลกอฮอล์ โดยเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง ผ่านลงในบิวทิวเอลกอฮอล์ 1 ชั่วโมง ไซลีนรวมกับ wax (1 : 1) ครึ่งชั่วโมง wax_1 ครึ่งชั่วโมงและwax_2 1 ชั่วโมง หุ้มเนื้อเยื่อใน wax_3 ตัดชิ้นเนื้อเยื่อหนา 8 ไมครอน ติดบนสไลด์ นำชิ้นเนื้อเยื่อมา dewax ด้วยไซลีน แล้วย้อมสี Ehrlish's acid haematoxylin และ Eosin. Dehydrate ด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้ใสด้วยไซลีน แล้วปิดชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ด้วย canada balsam.

7. <u>การศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยวิธีวิเคราะห์ทางฮีสโตเคมี</u>

ศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาลินฟอสฟาเตสและอะเซทธิลโคลินเอสเตอเรสในตับ ไต หัวใจ และสมองส่วนหลังของหนูไมซ์กลุ่มที่ได้รับพิษงูครั้งเดียวและหลายครั้งด้วยกล้องจุลทรรศ์ เปรียบเทียบระดับปริมาณของเอนไซม์ในทุกกลุ่ม

8. <u>ศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา</u>

ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเนื้อเยื่อตับ ไต และหัวใจในกลุ่มที่ได้รับพิษงูครั้งเดียว และหลายครั้งในทุกกลุ่ม

9. <u>การนับไมโตติคเซล</u> ((Mitotic cell)

ใช้เลนซ์วัตถุขนาดกำลังขยายดูณ 40 และ occular micrometer แบบตาราง การนับ นับจำนวนไมโตติคเซล ต่อจำนวนเซลตับหรือไต 1,000 เซล

10. <u>การนับฟาโกไซติคเซล</u> (Phagocytic cell)

ใช้เลนซ์วัตถุขนาดกำลังขยายดูณ 40 และ occular micrometer แบบตาราง นับจำนวนของฟาโกไซติคเซลในพื้นที่ของ 0.04 ตารางมิลลิเมตร การสุ่มตัวอย่างเนื้อที่ในไต ถือการดูบริเวณกรวยไตเป็นหลัก สุ่มนับเป็นจำนวน 5 แห่ง ในกลุ่มสุ่ม 5 แห่งเช่นกัน โดยถือบริเวณที่มีทั้ง portal area และ central vein การนับ นับจำนวนฟาโกไซติคเซล ต่อพื้นที่รวม 1 ตารางมิลลิเมตร