หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

ก. <u>สัตว์ทดลอง และการเตรียมสารละลาย</u>

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว พันธุ์วิสตาร์ (albino rat, wistar) เพศผู้ น้ำหนัก 180-200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

2. การเตรียมเลือดเพื่อหาระดับ SGOT และ SGPT ในซีรั่ม

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

2.1.1 ขวดโหลดมยาสลบหนู

2.1.1 บีกเกอร์

2.1.1 capillary tube ชนิด heparinized

2.1.1 centrifuge tube, microcentrifuge tube

2.1.1 laboratory centrifuge (Model H-103N จากบริษัท Kokusan Enshinki ประเทศญี่ปุ่น)

2.1.1.6 สำลี

2.2 สารเคมี

2.2.1 diethylether จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

2.3 วิธีการ

2.3.1 ทำให้หนูสลบโดยใส่ลงในขวดโหลดมยาสลบที่มี diethylether

2.3.2 นำหนูออกมาจากขวดโหลแล้วทำการเจาะเลือดจาก retro-orbital plexus บริเวณมุมหัวตาของหนู โดยใช้ capillary tube ชนิด heparinized

2.3.3 รองรับเลือดจากปลาย capillary tube ให้ได้ 2 มิลลิลิตร

2.3.4 นำไป centrifuge ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

2.3.5 นำส่วนใสที่เป็นซีรั่มแยกใส่ใน microcentrifuge tube แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ 4 ^{o}C ถ้ายังไม่นำไปวิเคราะห์ควรเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4-8 ^{o}C เก็บไว้ได้ประมาณ 3-5 วันโดยที่ไม่ทำให้ระดับของ SGOT และ SGPT เปลี่ยนแปลง

3. การเตรียมสารแขวนตะกอนอะเซตามิโนเฟน

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 โกร่งบดยา

3.1.2 hot plate

3.1.3 volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตรและ 10 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมี

3.2.1 อะเซตามิโนเฟน จากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 sucrose จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

3.3 วิธีการ

3.3.1 เตรียม 60% sucrose w/v

3.3.2 นำอะเซตามิโนเฟนมาแขวนตะกอนใน 60% sucrose w/v ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การเตรียมสารแขวนตะกอนแอนโดรกราโฟไลด์

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

4.1.1 โกร่งบดยา

4.1.2 hot plate

4.1.3 volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตรและ 50 มิลลิลิตร

4.2 สารเคมี

4.2.1 แอนโดรกราโฟไลด์จากภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย น้ำหนักโมเลกุล 350.44 มีค่า R = 0.06 ใน solvent system ของ methanol ต่อ chloroform = 1: 9 และจุดหลอมเหลว 230-231 ^{o}C

4.2.2 sucrose จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

4.3 วิธีการเตรียม

4.3.1 เตรียม 60% sucrose w/v

4.3.2 บดแอนโตรกราโฟไลด์ให้ละเอียด แล้วนำไปแขวนตะกอนใน 60% sucrose w/v ให้ได้ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. <u>วิธีการวิจัย</u>

1. การศึกษาขนาดของอะเซตามิโนเฟนที่จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับได้มากกว่า 50%

เป็นการศึกษาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของอะเซตามิโนเฟน ในการทำให้เกิดพิษต่อตับในหนูขาว โดยปรับปรุงวิธีการทดลองมาจาก Zieve และคณะ (1985)

1.1 ใช้สัตว์ทดลองทั้งหมดจำนวน 75 ตัวแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 15 ตัว

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมไม่ให้ intervention ใด ๆ

กลุ่มที่ 2 ให้ 60% sucrose 3 มิลลิลิตร 1 ครั้ง ทางปาก

กลุ่มที่ 3 ให้อะเซตามิโนเฟนขนาด 900 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก

กลุ่มที่ 4 ให้อะเซตามิโนเฟนขนาด 1200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก

กลุ่มที่ 5 ให้อะเซตามิโนเฟนขนาด 1500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก

1.2 วิธีการทดลอง แบ่งการทดลองออกเป็นขั้นตอนย่อย ๆ ดังนี้

ก. ศึกษาผลของอะเซตามิโนเฟนขนาดต่าง ๆ ต่อการก่อพิษต่อตับหนูขาว ที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังให้อะเซตามิโนเฟน ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 25 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว แล้วปฏิบัติดังนี้

1. เจาะเลือดหนูทุกกลุ่มที่เวลา T_0 (ก่อนการให้ intervention)
2. ป้อน 60% sucrose w/v ปริมาณ 3 มิลลิลิตรแก่หนูกลุ่ม sucrose
3. ป้อนอะเซตามิโนเฟนในขนาดต่าง ๆ ตามน้ำหนักของสัตว์ทดลอง สำหรับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมไม่ให้ intervention
5. จากนั้นเลี้ยงสัตว์ทดลองทุกกลุ่มด้วยอาหารและน้ำตามปกติ
6. เจาะเลือดหนูทุกกลุ่มที่เวลา T_1 (12 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)
7. จากนั้นฆ่าหนูทุกกลุ่มเพื่อตัดตับส่งตรวจชิ้นเนื้อทาง histopathology

ข. ศึกษาผลของอะเซตามิโนเฟนขนาดต่าง ๆ ต่อการก่อพิษต่อตับหนูขาว ที่เวลา 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมงหลังให้อะเซตามิโนเฟน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ ก. แต่เปลี่ยนเวลาในการเจาะเลือดเพื่อนำซีรั่มไปตรวจวัดระดับเอนไซม์ transaminase (SGOT และ SGPT) และเวลาในการฆ่าหนูเพื่อตัดตับส่งตรวจทาง histopathology ดังนี้

T_2 (24 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_3 (36 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_4 (48 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_5 (60 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_6 (72 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

2. การศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ ในการทดแทนเซลล์เก่าที่ถูกทำลายจากพิษต่อตับของอะเซตามิโนเฟน

2.1 ศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในการทดแทนเซลล์เก่าที่ถูกทำลายจากพิษต่อตับของอะเซตามิโนเฟน

2.1.1 ใช้สัตว์ทดลองทั้งหมดจำนวน 120 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 30 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้รับ treatment หรือ intervention ใด ๆ

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟน 1200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมอย่างเดียว 1 ครั้ง ทางปาก

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมอย่างเดียว 1 ครั้ง ทางปาก

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก ก่อนให้อะเซตามิโนเฟน 1200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.1.2 วิธีการทดลอง แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นกลุ่มย่อยเพื่อทำการทดลองทีละกลุ่ม รวมทั้งสิ้น 6 ครั้ง ใช้หนูขาวครั้งละ 20 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง n ที่ได้จะเท่ากับ 10 โดยแบ่งปฏิบัติดังนี้

ก. ศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ ที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน

1. เจาะเลือดสัตว์ทดลองทุกกลุ่มที่เวลาเริ่มต้น (T_0) ก่อนการให้ intervention ใด ๆ

2. ป้อนแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก แก่หนูในกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4

3. จากนั้นเลี้ยงหนูไว้ด้วยอาหารและน้ำตามปกติเป็นเวลา 2 วัน

4. ป้อนอะเซตามิโนเฟน 1200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม 1 ครั้ง ทางปาก แก่หนูในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4

5. แล้วจึงเจาะเลือดหนูทุกกลุ่มที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน (T_1)

6. ฆ่าหนูทุกตัวหลังการเจาะเลือด เพื่อตัดตับส่งตรวจชิ้นเนื้อตับทาง histopathology

ข. ศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ที่เวลา 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ ก. แต่เปลี่ยนเวลาในการเจาะเลือดเพื่อนำซีรั่มไปตรวจวัดระดับเอนไซม์ transaminase (SGOT และ SGPT) และเวลาในการฆ่าหนูเพื่อตัดตับส่งตรวจทาง histopathology ดังนี้

T_2 (24 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_3 (36 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

T_4 (48 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

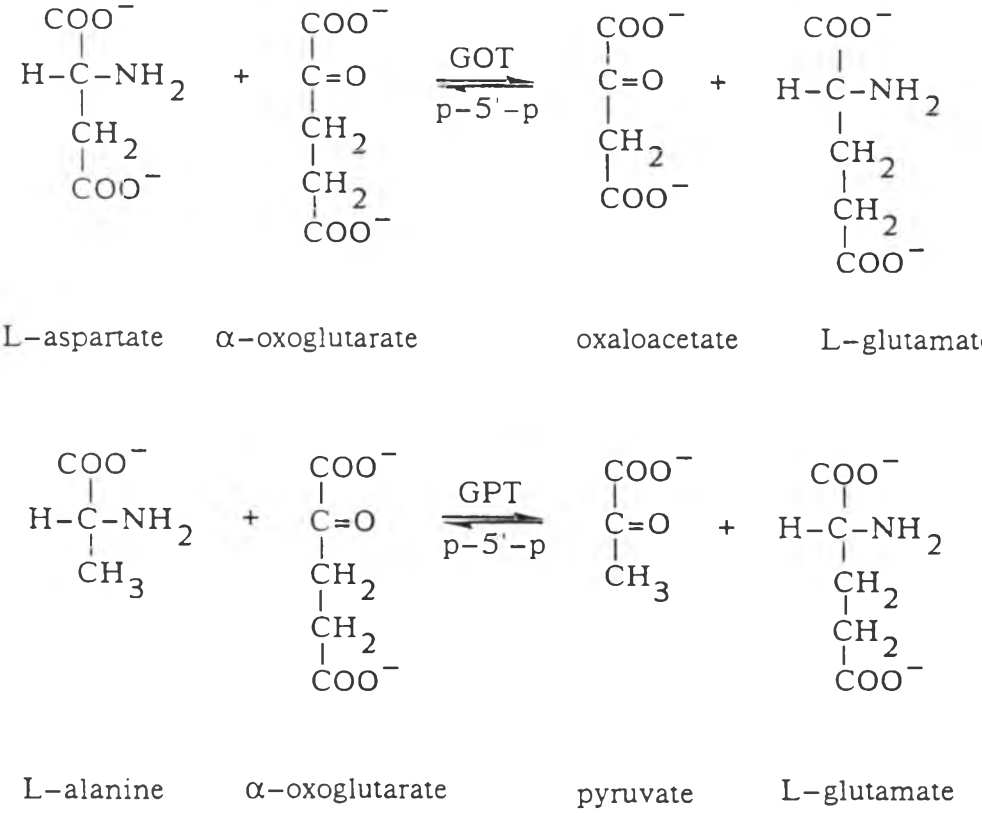
T_5 (60 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน)

2.2 ศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในการทดแทนเซลล์เก่าที่ถูกทำลายจากพิษต่อตับของอะเซตามิโนเฟน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3 แต่ลดขนาดของแอนโดรกราโฟไลด์ลงเป็น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

ค. <u>การวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT</u>

เอนไซม์ transaminase ประกอบด้วย aspatate aminotransferase (AST : aspatate transaminase) และ alanine aminotransferase (ALT : alanine transaminase) หรือที่รู้จักกันทั่วไปว่า glutamic oxaloacetate transaminase (GOT) และ glutamic pyruvate transaminase (GPT) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนไปยัง α-oxoacid และจาก α-oxoacid ไปยังกรดอะมิโน (รูปภาพที่ 17)



รูปภาพที่ 17 แสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ SGOT และ SGPT
(ทวีสุข กรรณล้วนและวิไลรัตน์ นุชประมูล, 2529)

เนื่องจากเอนไซม์ GOT มีมากในเซลล์หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อ และไต ส่วนเอนไซม์ GPT มีมากในเซลล์ตับ รองลงมาคือ ไต หัวใจ และกล้ามเนื้อ โดยเอนไซม์ทั้งสองนี้ มีอยู่ทั้งในส่วนของไซโตพลาสมและไมโตคอนเดรียของเซลล์ดังกล่าว ดังนั้นการวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ GOT และ GPT ในซีรั่มสามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับตับและหัวใจ โดยจะมีเอนไซม์ GPT มากกว่า GOT ในภาวะปกติที่เซลล์ตับไม่ถูกทำลาย ระดับของ GOT และ GPT ในซีรั่มจะมีน้อยมาก (ทวีสุข กรรณล้วน และวิไลรัตน์ นุขประมูล, 2529) แต่ถ้ามีการทำลายของเซลล์ตับเกิดขึ้น ไม่ว่าจะเป็นจากสารพิษ หรือเชื้อไวรัสก็ตาม จะทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ถูกขับออกมาในซีรั่ม ทำให้ระดับเอนไซม์ทั้งสองนี้สูงในซีรั่ม แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่าง species และพยาธิสภาพของโรคนั้น ๆ ต่อตับด้วย เช่น คนที่มีภาวะตับอักเสบเฉียบพลัน จะมีระดับของ GPT สูงขึ้นมากกว่า GOT แต่การก่อให้เกิดภาวะตับอักเสบแบบเฉียบพลันในหนู พบว่า ระดับเอนไซม์ทั้งสองในซีรั่มจะเพิ่มสูงขึ้นจากระดับปกติและการที่ระดับเอนไซม์ทั้งสองนี้จะสูงขึ้นมากน้อยขึ้นอยู่กับสภาพของเซลล์ที่ถูกทำลายและระยะเวลาที่เป็น (สุพิศ จินดาวณิค, 2523)

ในซีรั่มหนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ จะมีค่าปกติของระดับเอนไซม์ GOT ในซีรั่มเท่ากับ 62.5 $\pm$ 8.4 IU/l และค่าปกติของระดับเอนไซม์ GPT ในซีรั่มเท่ากับ 25.2 $\pm$ 2.05 IU/l (Gad and Chengelis, 1992)

หลักการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ GOT และ GPT ในซีรั่มคือ หลักการวิเคราะห์โดยการวัดเทียบสี (colorimetric method) ของ Reitman and Frankel ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ GOT และ GPT ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนไปยัง α-oxoacid แล้วทำให้ได้กรดอะมิโนและ α-oxoacid ตัวใหม่ ดังนั้นในระบบการวิเคราะห์เอนไซม์ GOT และ GPT นี้จึงประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 ตัวและโอโซเอซิด 2 ตัว หลักการของวิธีนี้คือ การหาปริมาณโอโซเอซิดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาหรือหาปริมาณของโอโซเอซิดที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยการให้โอโซเอซิดทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine จะได้สาร phenylhydrazone ของโอโซเอซิด ซึ่งมีสีในภาวะด่าง เนื่องจากในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ GOT จะมีโอโซเอซิดที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 ตัว ได้แก่ α-oxoglutarate และ pyruvate ซึ่งโอโซเอซิดทั้ง 2 ตัวของแต่ละปฏิกิริยาสามารถทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine ดังนั้นการวิเคราะห์เอนไซม์ GOT จะวัดสีที่เกิดจาก phenylhydrazone ของ oxaloacetate ส่วนการวิเคราะห์เอนไซม์ GPT จะวัดสีจาก phenylhydrazone ของ pyruvate โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1.1 Spectrophotometer (Ultraspec II LKB Biochem Ltd. ประเทศอังกฤษ)

1.2 disposible cuvettes ทรงสี่เหลี่ยมขนาด 1x1x3 เซ็นติเมตร

1.3 หลอดทดลอง

1.4 เครื่องช่วยผสม

1.5 ปิเปตอัตโนมัติ

1.6 อ่างน้ำร้อน

2. สารเคมี

2.1 reagents สำหรับวิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT จากบริษัท Clinical diagnostic ถนนพิษณุโลก เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร

3 วิธีการ

3.1 การทำ calibration curve โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ standard pyruvate และ substrate ดังนี้

No.	PYRUVATE STANDARD (ml)	GOT / GPT SUBSTRATE (ml)	H_2O (ml)	GOT ACTIVITY (SFunits/ml)	GPT ACTIVITY (SFunits/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
6	0.25	0.25	0.1	215	-

3.1.1 เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 มิลลิลิตรทุกหลอดทดลอง

3.1.2 ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

3.1.3 เติม 0.4 N NaOH 5 มิลลิลิตร ทุกหลอดทดลอง

3.1.4 ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3.1.5 นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) กับเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set ศูนย์

3.1.6 plot curve ระหว่าง GOT units และ GPT units กับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละค่า

3.1.7 ลากเส้นต่อแต่ละจุด จะได้ calibration curve ของการวิเคราะห์ระดับ SGOT หรือ SGPT

3.2 การวิเคราะห์ระดับ SGOT

3.2.1 ใส่ GOT substrate จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตามจำนวนที่ต้องการ

3.2.2 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C ในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลานาน 5 นาที

3.2.3 เติมซีรั่มที่ต้องการวัดลงไป 0.1 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง

3.2.4 ผสม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C นาน 30 นาที

3.2.5 เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง

3.2.6 ผสม และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

3.2.7 เติม 0.4 NaOH 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง

3.2.8 ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3.2.9 นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) กับเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set ศูนย์

3.2.10 นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหา GOT actvity จาก GOT calibration curve จะได้ค่า SGOT ที่ต้องการวัดในซีรั่ม

3.3 การวิเคราะห์หาระดับ SGPT

3.3.1 ใส่ GPT substrate จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตามจำนวนที่ต้องการ

3.3.2 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C ในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลานาน 5 นาที

3.3.3 เติมซีรั่มที่ต้องการวัดลงไป 0.1 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง

3.3.4 ผสม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C 15 นาที

3.3.5 เติม dinitrophenylhydrazine 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง

3.3.6 ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

3.3.7 เติม 0.4 NaOH 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง

3.3.8 ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3.3.9 นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) กับเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set ศูนย์

3.3.10 นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหา GPT activity จาก GPT calibration curve จะได้ค่า SGPT ที่ต้องการวัดในซีรั่ม

หมายเหตุ :

1. hemolyzed serum จะทำให้ได้ค่าของเอนไซม์ GOT และ GPT ที่สูงกว่าความจริง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์ GOT เป็น 15 เท่าของระดับเอนไซม์ในซีรั่ม และเอนไซม์ GPT ในเม็ดเลือดแดงมีมากเป็น 7 เท่าของระดับเอนไซม์ในซีรั่ม

2. lipidemia serum จะทำให้ค่าที่ได้ผิดไปเนื่องจากความขุ่น

3. ซีรั่มควรแยกภายใน 2 ชั่วโมงหลังการเจาะเลือด และถ้ายังไม่ตรวจทันทีให้เก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 $^{\circ}$C

4. ขณะทำการตรวจวัดระดับเอนไซม์ ควรให้ทุกหลอดทดลองมีช่วงเวลาที่จะทำปฏิกิริยาเท่า ๆ กัน และควรเท่ากันทุกครั้งโดยเฉพาะอย่างยิ่ง GOT ที่ใช้เวลาในการ incubate นาน 30 นาที มีโอกาสผิดพลาดได้เนื่องจากเหตุนี้มากที่สุด

5. ซีรั่มที่ขุ่นมากควรทำ serum blank โดยทำเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ทำการทดสอบ แต่ใส่ซีรั่มหลังจากเติม phenylhydrazine เรียบร้อยแล้วและใช้ serum blank สำหรับ set ศูนย์แทน reagent blank

ง. <u>การเตรียมชิ้นเนื้อตับหนูขาวเพื่อส่งตรวจทาง histopathology</u>

เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้สัตว์ทดลอง จึงสามารถตัดชิ้นเนื้อตับแล้วนำไปทดสอบทาง histopathology เพื่อนำไปประกอบกับผลทางชีวเคมี และยังใช้เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้พยาธิสภาพของเซลล์ตับและการเกิด mitosis ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากการทดสอบทาง histopathology แสดงลักษณะของเซลล์ตับที่เกิดขึ้นภายหลังการได้รับสารพิษ หรือในขณะที่มีการ regeneration ได้อย่างชัดเจน

ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้ส่งชิ้นเนื้อตับหนูขาวที่ได้จากการทดลอง ไปทำการทดสอบทาง histopathology ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง สมลักษณ์ พวงชมภู เป็น pathologist ในการแปลผลทาง histopathology ตลอดงานวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1.1 แผ่น froid ขนาด 3x4 นิ้ว

1.2 ใบมีดโกน

1.3 ขวดใส่ชิ้นเนื้อขนาด 60 มิลลิลิตร สำหรับใส่ชิ้นเนื้อตับส่งตรวจทาง histopathology

2. สารเคมี

2.1 10% neutral formalin ที่เตรียมจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีการ

3.1 การเก็บตัวอย่างส่งตรวจทาง histopathology

3.1.1 เตรียม 10% neutral formalin ลงในขวดใส่ชิ้นเนื้อประมาณ 40 มิลลิลิตร สำหรับแช่ชิ้นเนื้อตับส่งตรวจทาง histopathology

3.1.2 หลังจากฆ่าหนูโดยวิธีดึงคอ ให้กระดูกคอแยกออกจากกันแล้ว เปิดช่องท้องหนูขาว ตัดตับหนูขาวในส่วนของ lobe ล่างซ้าย ให้มีขนาด 5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วใส่ลงไปในขวดน้ำยา 10% neutral formalin ที่เตรียมไว้

3.2 ขั้นตอนในการทดสอบทาง histopathology ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้ (Humason, 1979)

1. Fixation เป็นขั้นตอนแรกหลังจากได้ชิ้นเนื้อออกมาจากตัวอย่าง ต้องทำการแช่ชิ้นเนื้อลงใน 10% neutral formalin ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดใส่ชิ้นเนื้อ เพื่อเป็นการคงสภาพส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ชิ้นเนื้อตับนั้น ให้อยู่ในสภาพเหมือนเดิมทุกประการ

2. Washing and dehydration เป็นการ remove ส่วนเกินของน้ำยาที่ใช้ในการ fixation ออกโดยใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 30%, 50%, 70%, 90% และ absolute alcohol

3. Clearing เป็นการ remove เอาแอลกอฮอล์ออก แล้วให้ wax infilatration

4. Wax infiltration และ costing เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อป้องกันการ collapse และ distortion ของเนื้อเยื่อตับในระหว่างการตัด (sectioning)

5. Staining โดยทั่วไปนิยมใช้ haematoxyline and eosin technique โดยมีวัตถุประสงค์คือ เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อต่าง ๆ และส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่น การเห็น nucleus ของเซลล์ติดสีน้ำเงินของ haematoxylin และ

cytoplasm ติดสีชมพูของ eosin นอกจากนี้ยังสามารถย้อมพิเศษเมื่อต้องการรายละเอียดเพิ่มเติม เช่น การย้อม PAS (periodic acid schiff) เพื่อดู glycogen และ soluble polysaccharides ตลอดจนการย้อมด้วย Oil red O เพื่อดู lipid เป็นต้น

จ. การตรวจสอบทาง pathophysiology

ใช้วิธีการแบ่งระดับของการถูกทำลายของเซลล์ตับจากอะเซตามิโนเฟนร่วมกับการตรวจนับจำนวนเซลล์ตับที่อยู่ในสภาวะต่าง ๆ อีกด้วย

1. การแบ่งระดับการถูกทำลายของเซลล์ตับ

อาศัยลักษณะต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ เช่น บริเวณที่ถูกทำลาย จำนวนแถวของเซลล์ที่ถูกทำลายรอบ ๆ central vein และ periporal vein จำนวน central vein ที่มี centrilobular degeneration การทำลาย endothelial cells และการเกิด fat vacuoles โดยเรียงลำดับจากปกติไปจนถึงเกิดการทำลายเซลล์ตับที่รุนแรงดังนี้

ระดับ 0(-) = ปกติ
ระดับ +1 = น้อย
ระดับ +2 = ปานกลาง
ระดับ +3 = รุนแรง

2. การตรวจนับจำนวนเซลล์ตับที่อยู่ในสภาวะต่าง ๆ

อาศัยลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์ตับที่มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์ โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่

เซลล์ปกติ (normal cell)
เซลล์เสื่อม (degenerating cell)
เซลล์ตาย (necrotic cell)
เซลล์ที่พร้อมในการแบ่งตัว (mitotic cell)

วิธีการตรวจนับจำนวนเซลล์

2.1 ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีลักษณะต่าง ๆ ตามที่กำหนดไว้ข้างต้นต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด 100 เซลล์ ต่อ 1 หน่วยพื้นที่ที่มองเห็นในกล้องจุลทรรศน์

2.2 ตรวจนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 5 หน่วยพื้นที่ต่อ 1 ตัวอย่าง (1 slide)

2.3 นำค่าที่ได้มาคำนวนหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แต่ละชนิดใน 1 ตัวอย่าง

2.4 แล้วจึงนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แต่ละชนิดของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม

การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การแสดงผลการทดลอง แสดงเป็น 2 ลักษณะ คือ

   1.1 ตาราง

   1.2 แผนภูมิแท่งและกราฟเส้น

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

   2.1 ค่าเฉลี่ย และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SEM) ใช้การนำเสนอข้อมูลของพารามิเตอร์ทางชีวเคมีและจำนวนเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการตรวจสอบทาง histopathology

   2.2 Pair's t-test สำหรับข้อมูลในกลุ่มเดียวกันที่เวลาต่างกัน

   2.3 One-way analysis of variance หรือ ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้โดยวิธี Duncan's new multiple range test สำหรับข้อมูลต่างกลุ่มที่มีมากกว่า 1 กลุ่ม ที่เวลาเดียวกัน