



บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่อง centrifuge
2. เครื่อง water bath
3. โฟ uv. ขนาด 30 วัตต์
4. ถาดอลูมิเนียมพร้อมอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับผ่าตัดได้แก่ กรรไกร บลาจตรงและบลาจโค้ง, ปากคีบ (forcep), มีดผ่าตัด
5. stomach tube 1 อัน
6. syringe ขนาด 1 ml
7. cylinder ขนาด 50, 100, 500 ml
8. Beaker ขนาด 50, 100, 500 และ 1000 ml
9. หลอดสำหรับปั่นแยกสาร (centrifuge tube) ขนาด 15 ml
10. pasteur pipette
11. coplin jar สำหรับย้อมสไลด์
12. glass slide , coverslip
13. ถาดสำหรับวางสไลด์
14. aluminium foil

3.1.2 สารเคมี

1. potassium nitrate (KNO_3)
2. corn oil
3. 5 - Bromodeoxyuridine (5 BrdU)
4. colchicine powder
5. potassium chloride (KCl)
6. methanol
7. glacial acetic acid
8. สี Hoechst 33258 ($\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O} \cdot 3\text{HCl}$)
9. sodium chloride (NaCl)
10. tri- sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
11. di - sodium hydrogen orthophosphate anhydrous
(Na_2HPO_4)
12. potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)
13. potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
14. citric acid
15. conc.sulfuric acid
16. diethyl ether ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)
17. ethyl alcohol
18. Giemsa powder
19. น้ำยาทาเล็บชนิดไม่มีสี
20. น้ำกลั่น

3.2 วิธีการทดลอง

สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง - หนูเม้าส์เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 45-50 กรัม
จำนวน 24 ตัว

ปริมาณทั้งหมดของไนเตรท (total dose of nitrate) ที่ให้แก่หนูเม้าส์
คือ 80, 160, 320 mg/kg.bw โดยแต่ละ dose แบ่งไนเตรทให้หนูเม้าส์ได้รับ
เท่าๆกันทุกวันเป็นเวลานาน 20 วัน

วิธีการได้รับไนเตรทของหนูเม้าส์ (route of administration)
ได้รับเปรียบเทียบกัน 2 วิธี โดยใช้

- วิธีได้รับทางปากโดยใช้ stomach tube
- วิธีฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection)

ระยะเวลาที่ได้รับไนเตรทของหนูเม้าส์ ได้รับติดต่อกันนาน 20 วัน

วิธีทดลอง 3.2.1 แบ่งหนูเม้าส์เป็น 2 การทดลองตามวิธีการได้รับไนเตรท ดังนี้

การทดลองที่ 1 ได้รับไนเตรททางปาก

การทดลองที่ 2 ได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง

การทดลองที่ 1 ได้รับไนเตรททางปาก

แบ่งการทดลองที่ 1 เป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มใช้หนู 3 ตัว ทำการศึกษาดังนี้

กลุ่มที่ 1.1 เป็นกลุ่มควบคุม (control group) ให้หนูกินน้ำวันละ
1 ml

กลุ่มที่ 1.2 ให้หนูกินไนเตรทปริมาณทั้งหมด 80 mg/kg.bw โดย
แบ่งให้หนูกินวันละ 4mg/kg.bw จำนวน 1 ml

กลุ่มที่ 1.3 ให้หนูกินไนเตรทปริมาณทั้งหมด 160 mg/kg.bw โดย
แบ่งให้หนูกินวันละ 8mg/kg.bw จำนวน 1 ml

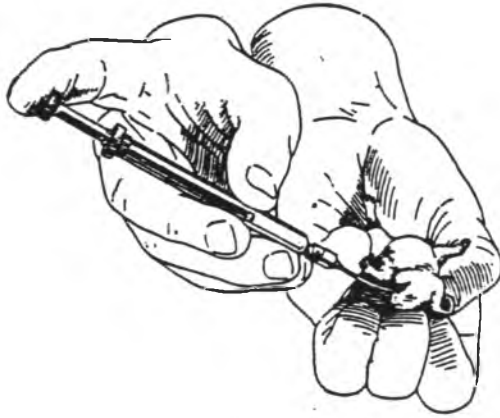
กลุ่มที่ 1.4 ให้หนูกินไนเตรทปริมาณทั้งหมด 320 mg/kg.bw โดยแบ่ง
ให้หนูกินวันละ 16 mg/kg.bw จำนวน 1 ml

การทดลองที่ 2 ได้รับโนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง

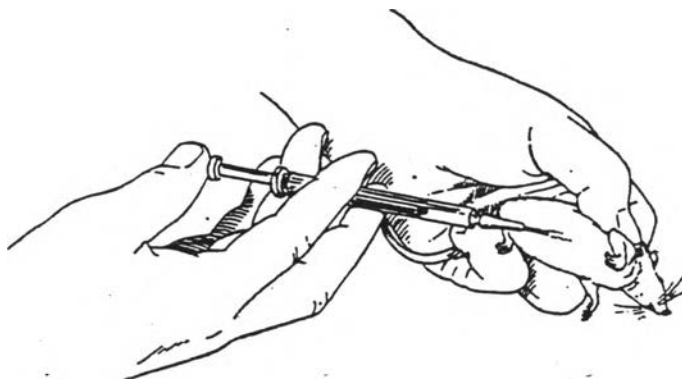
แบ่งการทดลองที่ 2 เป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มใช้หนู 3 ตัว ทำการศึกษาดังนี้

- กลุ่มที่ 2.1 เป็นกลุ่มควบคุม (control group) ให้ฉีดน้ำเข้าช่องท้องหนู วันละ 1 ml
- กลุ่มที่ 2.2 ฉีดโนเตรทเข้าช่องท้องหนูปริมาณทั้งหมด 80 mg/kg.bw โดยแบ่งฉีดเข้าช่องท้องหนูวันละ 4 mg/kg.bw จำนวน 1 ml
- กลุ่มที่ 2.3 ฉีดโนเตรท เข้าช่องท้องหนู ปริมาณทั้งหมด 160 mg/kg.bw โดยแบ่งฉีดเข้าช่องท้องหนูวันละ 8 mg/kg.bw จำนวน 1 ml
- กลุ่มที่ 2.4 ฉีดโนเตรทเข้าช่องท้องหนูปริมาณทั้งหมด 320 mg/kg.bw โดยแบ่งฉีดเข้าช่องท้องหนูวันละ 16 mg/kg.bw จำนวน 1 ml

ปริมาณของโนเตรทที่ให้แก่หนู คัดจากปริมาณโนเตรทจริง ๆ ที่มีอยู่ในโปดัลเทียมโนเตรท โดยขณะทำการทดลองจะให้โนเตรทในรูปสารละลายโปดัลเทียมโนเตรท (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย) และคำนวณความเข้มข้นของโปดัลเทียมโนเตรทที่ใช้จากปริมาณของโนเตรทที่ต้องการให้แก่หนู (กฤษณา ชุตินา, 2523)



รูปที่ 11 แสดงวิธีให้หนูเมาส์กินแค้วย stomach tube



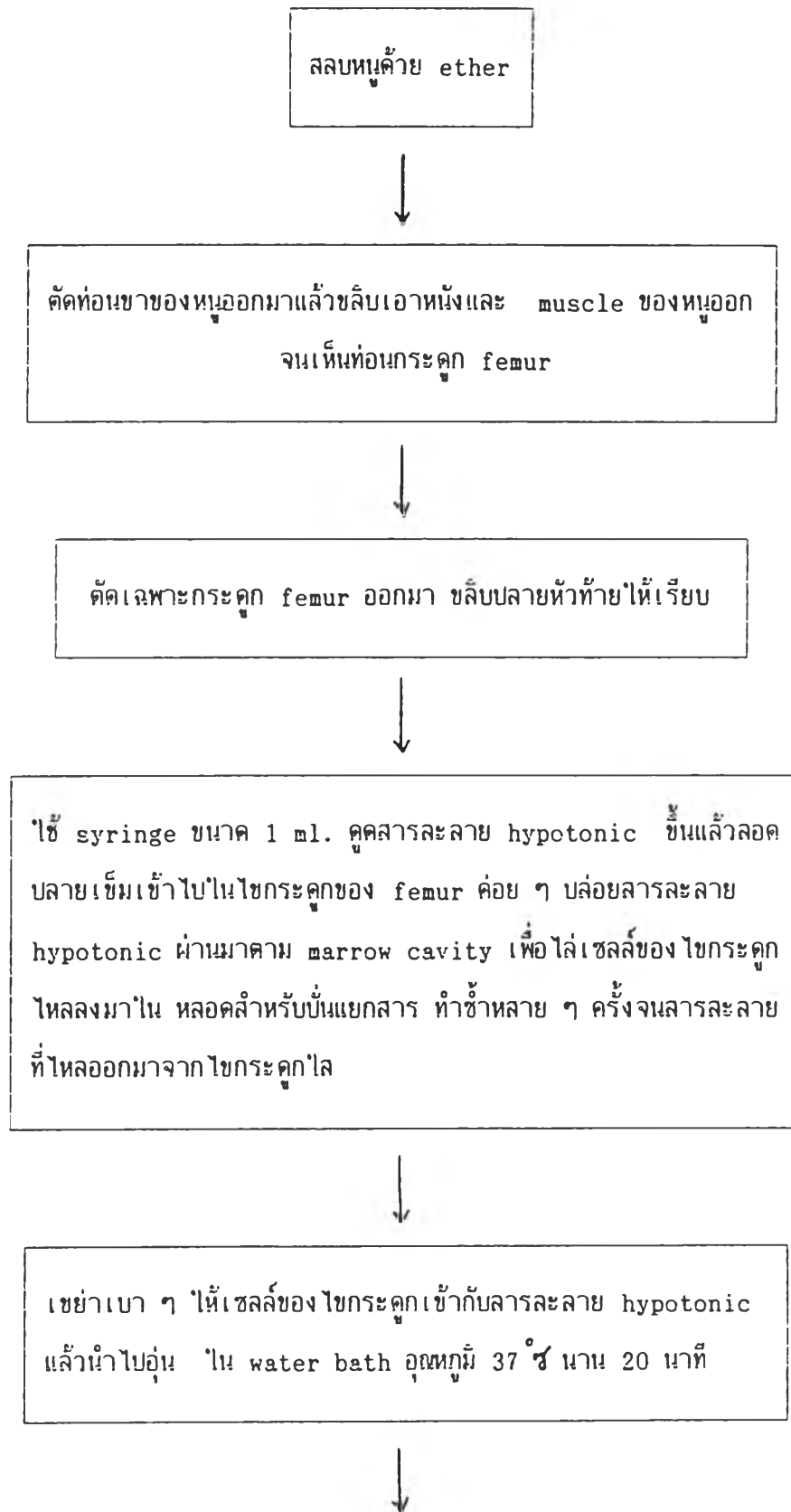
รูปที่ 12 แสดงวิธีฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) หนูเมาส์

3.2.2 โนนุแต่ละกลุ่มของทั้ง 2 การทดลอง หลังจากครบ 20 วันแล้ว จะทำการศึกษาโครโมโซมจากไขกระดูกของหนูเม้าส์ เพื่อดูการเกิดการแลกเปลี่ยน ดีเอ็นเอ ระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกันโดยวิธี sister chromatid exchange technic ดังนี้

1. ฉีด 5 BrdU ปริมาณ 500 mg/kg.bw (ใช้ corn oil เป็นตัวทำละลาย) จำนวน 1 ml ด้วยวิธีฉีดใต้ผิวหนัง แก่หนูแล้วทิ้งไว้ 24 ชม. (Long Jian et.al, 1985) การฉีด 5 BrdU ให้แก่หนูด้วยวิธี ฉีดใต้ผิวหนังนี้ เวลาฉีดต้องดึงหนังคอดหนูขึ้น สอดปลายเข็มเข้าไปใต้หนังคอดหนูในแนวนอน แล้วปล่อยสารละลาย 5 BrdU เข้าใต้ผิวหนังช้า ๆ จนหมดจึงดึงเข็มออก คลึงตรงบริเวณที่ฉีดเบา ๆ เพื่อป้องกันการซึมออกมานอกผิวหนังของ 5 BrdU (William, 1965)

2. ฉีด colchicine ปริมาณ 4 mg/kg.bw (colchicine เป็นสารที่ทำให้โครโมโซมที่ต้องการศึกษาลอยตัวอยู่ในเซลล์) โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย จำนวน 1 ml. ด้วยวิธี intraperitoneal injection ทิ้งไว้นาน 30 นาที

3. ทำการฆ่าหนูเพื่อคูดเอาเซลล์ไขกระดูกจากกระดูก femur มา harvest ดังนี้



นำหลอดออกมาจาก water bath แล้วหยดสารละลาย fixative ลงในหลอดทั้งหมด 4 ครั้ง ๆ ละ 8 หยด ห่างกันครั้งละ 5 นาที เป่า (blow) เบา ๆ ทุกครั้งที่เติมสารละลาย fixative แล้วนำไปปั่นที่ 1500 rpm นาน 10 นาที



ดูดส่วนน้ำทิ้งไป แล้วเติมสารละลาย fixative ลงไป 5 ml. เป่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 1500 rpm นาน 10 นาที



ทำซ้ำแบบเดิมอีก 2 ครั้ง แล้วนำเอาส่วนที่เป็นตะกอนมาหยดลงบน สไลด์ที่สะอาด แล้วทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน



ย้อมสไลด์ด้วยสี Hoechst 33258 solution นาน 2 ชั่วโมง



แกว่งล้างสไลด์เบา ๆ ใน McIlvain buffer



หยด McIlvain buffer ลงบนสไลด์ 3-4 หยดให้กระจายทั่วบนสไลด์ บิดด้วย coverslip และใช้น้ำยาทาเล็บชนิดไม่มีสีปิด (seal) รอบ ๆ ขอบ coverslip เพื่อป้องกันการระเหยของ buffer



นำสไลด์ไปส่องด้วยไฟ UV ขนาด 30 วัตต์ นาน 2 ชั่วโมง โดยให้ระยะห่างระหว่างสไลด์กับไฟ UV ห่างกันเป็นระยะ 5 เซนติเมตร



แกะ coverslip ออก นำสไลด์ไปแช่ใน saline sodium citrate solution (2 X SSC) ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทั้งไว้ให้แห้ง



ย้อมด้วย Giemsa นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทั้งสไลด์ให้แห้ง จึง mount สไลด์



ศึกษาโครโมโซมจากไขกระดูกของหนูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

3.3 การรวบรวมข้อมูล (data collection)

ในแต่ละกลุ่ม ศึกษาเซลล์ทั้งหมด 150 เซลล์ (หนู 1 ตัว ศึกษา 50 เซลล์) นับจำนวนโครโมโซมทั้งหมดที่มีการเกิด SCE ว่ามีจำนวนเท่าไรแล้วคำนวณจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCE ต่อ เซลล์ (SCE/CELL) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในหนูเมาส์กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองของแต่ละวิธีที่ได้รับไนเตรท (Turnd et.al, 1991)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

นำค่าเฉลี่ย SCE/CELL ของแต่ละกลุ่ม มาเปรียบเทียบกันด้วยวิธีทางสถิติ โดยใช้ ANOVA TEST คูในกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณต่าง ๆ ทางปาก และกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณต่าง ๆ ด้วยวิธีฉีดเข้าทางช่องท้องนั้น ในแต่ละวิธีที่ได้รับมีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไรและวิเคราะห์เปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับไนเตรทในปริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ มีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผลต่อไป