บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว เพศผู้ พันธุ์วิสตาร์ (Wistar) น้ำหนักระหว่าง 200 - 250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย และดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารเคมีและเครื่องมือ

สารทดลองที่ศึกษา คือ n - (2-propylpentanoyl) urea (VPU) ถูกสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

บริษัท ซีพีซี ประเทศไทย

Mazola pure corn oil

บริษัท คลินิคอลไดแอคโนสติคส์ ประเทศไทย

SGOT (AST) & SGPT (ALT) Sets

บริษัท อี เมอร์ค ประเทศเยอรมันนี

Absolute ethanol

Diethylether

Hydrochloric acid

บริษัท ลีโอ ฟาร์มาซูติคัล ประเทศเดนมาร์ค

Heparin 5,000 IU/ml

บริษัท เม แอน เบเกอร์

Gardenal sodium (200 mg/ml) (Phenobarbital)

บริษัท ซิกมา เคมิคัล ประเทศสหรัฐอเมริกา

Bovine serum albumin (Fraction V) (1.2% BSA)

Calcium chloride

Collagenase (Type IV)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

5',5'-Dithiobenzoic acid

L- glutamine (200 ml)

Magnesium sulfate

Methyl cellulose

Minimum Essential Medium Eagle (MEM)

Metyrapone

2-(p-chlorophenoxyl)-2-methylpropionic acid (Clofibric acid)

Pentenoic acid

Potassium phosphate (monobasic)

Potassium chloride

Sodium bicarbonate

Sodium chloride

Sodium gluconate

Sodium phosphate (dibasic)

Sodium phosphate (monobasic)

Sulfosalicylic acid

Trypan blue solution 0.4%

2-Thiobarbituric acid

Trichloroacetic acid

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10% Neutral Formalin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บริษัท ไทยอินดัสเตรียลแก๊ส

Carbogen gas (O_2 95% CO_2 5%)

เครื่องมือ

Autopipets และ pipet tips ขนาด 10-5,000 µl (Pipetman, Gilson Medical Electronic, France)

Capillary tube ชนิด heparinized

Centrifuge (H-103 N,Kokusan Enskinki So., Ltd., Japan)

Counting chamber (Neubauer, bright-line)

Dissecting instruments

Disposible tuberculin syringe with needle

Glasswares

Ice bath

Light microscope

Liver perfusion apparatus

Magnetic stirrer with magnetic bar (S-8252-1, American,USA)

Metabolic shaker bath (Maxi-Shake, Heto, Denmark)

Microtublue pump (501S, Watson-Marlow Ltd., England)

Operation table

pH meter (Backman Instruments, USA)

Single pan balance (Sartorious 1213MP, Germany)

Sonicator

Spectrophotometer (Ultraspec II , LKB Biochrome Ltd., England)

Torsion balance (Mettler AJ 180, Mettler Instruments, Switzerland)

Vortex mixer (Clay adams, USA)

Water bath (Hetofrig, Heto, Denmark)

3. การเตรียมสารที่ใช้ในการศึกษาและการตรวจสอบ

3.1. การศึกษา In Vivo

3.1.1. การเตรียมสารแขวนตะกอนของ เอ็น - (2-โพรพิลเพนทา โนอิล) ยูเรีย (VPU)

1. เตรียม 1 % methyl cellulose w/v โดยชั่ง methyl cellulose มา 1 กรัม โปรยลงในน้ำกลั่น 100 ml ทิ้งไว้ให้ methyl cellulose พองตัวจนละลายเข้ากัน

2. นำ VPU มาแขวนตะกอนใน 1 % methyl cellulose นำไป vortex และทำให้อนุภาคเล็กๆกระจายตัวด้วย sonicator

3.1.2. การเตรียม phenobarbital (PB 80 mg/kg)

เจือจาง phenobarbital (gardenal sodium 200 mg/ml) ให้มีความเข้มข้น 20 mg/0.5 ml ด้วยน้ำกลั่น ใส่ในขวดยาสีชา

3.1.3. การเตรียมสารแขวนตะกอนของ clofibric acid (CF 100 mg/kg)

1. นำ clofibric acid มาแขวนตะกอนใน corn oil

2. จากนั้นนำไป vortex แล้วทำให้อนุภาคเล็กๆกระจายตัวด้วย sonicator

3.1.4. การเตรียมเลือดเพื่อหา activity ของ SGOT และ SGPT

1. ลบหนูในขวดโหลดมลบที่มีสำลีชุบ diethylether

2. นำหนูออกจากขวดโหล เจาะเลือดจาก retro-orbital plexuses บริเวณมุมหัวตาของหนูโดยใช้ capillary tube ชนิด heparinized

3. นำหลอดทดลองรองรับเลือดจากปลาย capillary tube (ให้ได้ 2 ml)

4. วางหลอดทดลองใน ice bath

5. นำไป centrifuge ที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

6.นำส่วนใสที่เป็นซีรั่มแยกใส่ใน microcentrifuge tube นำไปแช่ในน้ำแข็ง เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ 4°C ถ้ายังไม่นำไปวิเคราะห์ควรเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4-8°C เก็บไว้ได้ประมาณ 3-5 วัน โดยที่ไม่ทำให้ activity ของ SGOT และ SGPT เปลี่ยนแปลง

การวิเคราะห์ activity ของเอนซัยม์ SGOT & SGPT

1 การทำ calibration curve ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ standard pyruvate และ substrate ดังนี้

Tube No.	Pyruvate standard (ml)	GOT หรือ GPT substrate (ml)	H_2O (ml)	GOT Activity (SF units/ml)	GPT Activity (SF units/ml)
1	0.00	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

1.1 เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 ml ทุกหลอดทดลอง

1.2 ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

1.3 เติม 0.4 N NaOH 5 ml ทุกหลอดทดลอง

1.4 ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

1.5 นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set 0

1.6 plot curve ระหว่าง GOT units และ GPT units กับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละค่า

1.7 ลากเส้นต่อแต่ละจุดจะได้ calibration curve ของการวิเคราะห์ activity ของ SGOT & SGPT

2. การวิเคราะห์ activity ของ SGOT

2.1 ใส่ GOT substrate 0.5 ml. ในหลอดทดลองทุกหลอด

2.2 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 นาที

2.3 เติมซีรั่ม 0.1 ml. ต่อ 1 ตัวอย่าง

2.4 ผสม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที

2.5 เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 ml ต่อหลอดทดลอง

2.6 ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที

2.7 เติม 0.4 N NaOH 5 ml ต่อหลอดทดลอง

2.8 ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

2.9 นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง

2.10 นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหา GOT activity จาก GOT calibration curve จะได้ค่า SGOT ในซีรั่ม

3. การวิเคราะห์ activity ของ SGPT

3.1 ใส่ GPT substrate 0.5 ml ในหลอดทดลองทุกหลอด

3.2 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 นาที

3.3 เติมซีรั่ม 0.1 ml ต่อ 1 ตัวอย่าง

3.4 ผสม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที

3.5 เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 ml ต่อหลอดทดลอง

3.6 ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที

3.7 เติม 0.4 N NaOH 5 ml ต่อหลอดทดลอง

3.8 ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

3.9 นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง

3.10 นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหา GPT activity จาก GPT calibration curve จะได้ค่า SGPT ในซีรั่ม

สิ่งที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์

1. hemolyzed serum จะทำให้ได้ค่าที่สูงกว่าความเป็นจริง เนื่องจากเม็ดเลือดมีเอนซัยม์ GOT เป็น 15 เท่าของที่มีอยู่ในซีรั่ม และ เอนซัยม์ GPT เป็น 7 เท่าของที่มีอยู่ในซีรั่ม

2. lipidemia serum จะทำให้ค่าที่ได้ผิดไป เนื่องจากความขุ่น

3. ซีรั่มควรแยกภายใน 2 ชั่วโมง นับจากเจาะเลือดมา และเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 °C ถ้ายังไม่ตรวจทันที

4. พยายามให้ทุกหลอดมีช่วงเวลาที่จะทำปฏิกิริยาเท่ากันและควรเท่ากันทุกครั้ง

ข้อแนะนำในการวิเคราะห์

1.ซีรั่มที่ขุ่นมาก ควรทำ serum blank โดยทำเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ทำการทดสอบ แต่ซีรั่มหลังจากเติม dinitrophenylhydrazine แล้วใช้ serum blank set zero แทน reagent blank

2.ซีรั่มที่มี aldehydes , ketone และ ketoacid สูง จะทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าความเป็นจริง แก้ไขโดยการทำ serum blank

3.ตัวอย่างที่มีค่าเอ็นซัยม์ GOT & GPT สูงกว่าค่าที่มีใน callibration curve ให้จือจางซีรั่มด้วยน้ำกลั่นแล้วคูณค่าที่ได้จากกราฟด้วย dilution factor เช่น เจือจางซีรั่มเป็น 1 : 5 (ซีรั่ม 1 : น้ำ 5) คูณค่าที่อ่านได้จากกราฟด้วย 5 เป็นต้น

3.1.5. การเตรียมชิ้นเนื้อตับหนูขาวเพื่อส่งตรวจทาง histopathology

1. เตรียม 10 % neutral formalin ลงในขวดใส่ชิ้นเนื้อ 40 มิลลิลิตร สำหรับแช่ชิ้นเนื้อตับส่งตรวจทาง histopathology

2. หลังจากฆ่าหนูโดยวิธีเลื่อนกระดูกคอ (dislocation) เปิดช่องท้องหนูขาวแล้วตัดตับหนูขาวทุก lobe ใส่ในขวดที่มี 10 % neutral formalin ที่ label ไว้แล้ว

การตรวจทาง histopathology

การทดสอบทางด้าน histopathology เป็นพารามีเตอร์หนึ่งที่ใช้บ่งชี้พยาธิสภาพของเซลล์ตับ ในการวิจัยนี้ได้ส่งชิ้นเนื้อตับหนูขาวที่ได้จากการทดลองที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง สมลักษณ์ พวงชมภู เป็น pathologist ในการแปลผลทาง histopathology ตลอดงานวิจัย

การทดสอบทาง histopathology ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ดังนี้ (Humason, 1979)

1. Fixation เป็นขั้นตอนแรกหลังจากได้ชิ้นเนื้อออกมาจากตัวอย่างต้องทำการแช่ชิ้นเนื้อลงใน 10 % neutral formalin ในขวดที่เตรียมไว้เพื่อคงสภาพส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ชิ้นเนื้อตับให้อยู่สภาพเหมือนเดิม

I18301685X

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

3. Clearing เป็นการ remove เอาแอลกอฮอล์ออก แล้วให้ wax infiltration

4. Wax infiltration และ coating เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อป้องกันการ collapse และ distortion ของเนื้อเยื่อตับระหว่างการตัด (sectioning)

5. Staining โดยทั่วไปนิยมใช้ haematoxylin and eosin techique โดยมีวัตถุประสงค์คือ เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อต่างๆและส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่น การเห็น nucleus ของเซลล์ติดสีน้ำเงินของ haematoxylin และ cytoplasm ติดสีชมพูของ eosin นอกจากนี้ยังสามารถย้อมพิเศษเมื่อต้องการรายละเอียดเพิ่มเติม เช่น การย้อม PAS (periodie acid schiff) เพื่อดู glycogen และ soluble polysaccharides ตลอดจนการย้อม Oil red O เพื่อดู lipid และ von Kossa เพื่อตรวจหาแคลเซียมที่สะสมอยู่ (calcium deposits) เป็นต้น

การแบ่งระดับการถูกทำลายของเซลล์ตับ อาศัยลักษณะต่างๆที่เกิดขึ้นกับเซลล์ เช่น การคั่งของเลือด การบวมของเซลล์ การเกิด haemorrhage การเสื่อมของเซลล์ขอบเขตหรือบริเวณที่มีการเสื่อมและการทำลายของเซลล์ เช่น ลักษณะของเซลล์ที่ถูกทำลายรอบๆ central vein และ periportal vein การเกิด coagulative necrosis จำนวน central vein ที่มี centrilobular degeneration การทำลาย endothelial cells และการเกิด fat vacuoles การเกิด regeneration ของเซลล์ โดยเรียงลำดับจากปกติไปจนถึงเกิดการทำลายเซลล์ตับที่รุนแรงดังนี้

ระดับ 0 = ปกติ (normal)
ระดับ +1 = น้อย (mild degree)
ระดับ +2 = ปานกลาง (moderate degree)
ระดับ +3 = รุนแรง (severe degree)

ปกติ คือ เซลล์ตับมีลักษณะปกติ

น้อย คือ มีการคั่งของเลือดใน sinusoid space of disse ลดลง มีการบวมของเซลล์ตับ นิวเคลียสถูกเบียดไปด้านข้างและเกิดการเสื่อมแบบ pychotic degeneration มีการเสื่อมของเซลล์รอบ portal vein

ปานกลาง คือ มีการเสื่อมของเซลล์ลักษณะ vacuolar degeneration บริเวณ periportal area ถึง midzone นิวเคลียสถูกเบียดไปด้านข้างเกิดการเสื่อมแบบ karyorrhexis พบ fat vacuoles (Oil red O positive) ไม่พบ dystrophic calcification (von Kossa negative)

รุนแรง คือ มีการเสื่อมและการตาย ลักษณะเซลล์มี vacuolar degeneration บริเวณ periportal area, midzone ถึงรอบๆ centrilobular เกิด coagulative necrosis และ haemorrhage นิวเคลียสถูกเบียดไปด้านข้าง ขนาดเล็กลงหรือไม่เห็นขอบเขตชัดเจน เกิดการสลายตายไป (karyolysis) พบ fat vacuoles (Oil red O positive) และพบ hyaline droplets (PAS positive) ไม่พบ dystrophic calcification (von Kossa negative)

3.2. การศึกษา In Vitro

3.2.1.การเตรียมสารละลายของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย (VPU) นำ VPU ตามขนาดความเข้มข้นที่ต้องการ (1, 2 ,3 และ 4 mM) มาละลายใน DMSO

3.2.2. การเตรียมสารละลาย 4-pentenoic acid เจือจาง 4-pentenoic acid ด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 1 mM

3.2.3. การเตรียมสารละลาย metyrapone นำ metyrapone มาละลายใน DMSO เพื่อให้มีความเข้มข้น 1 mM

3.2.4. การเตรียมสารละลาย DMSO ใช้สารละลาย DMSO ในเซลล์ตัวอย่างๆละ 10 µl (0.055 M)

3.2.5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาว

เตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาวใช้วิธีของ Berry และ Friend (1969) ซึ่งปรับปรุงโดย Stacey และ Priestly (1978) แต่เปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมกับอุปกรณ์ที่มีอยู่ใช้ Modified Kreb's and Henseleit Physiological solution (1932) ซึ่งให้ carbogen และอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตลอดเวลาดังนี้

1. สารละลาย A : Calcium free medium (Ca^{2+} free buffer) ประกอบด้วย

1.1 NaCl	96	mM
1.2 KCl	1.4	mM
1.3 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.7	mM
1.4 KH_2PO_4	2.5	mM
1.5 $NaHCO_3$	2.5	mM
1.6 Sodium gluconate	21.7	mM

(equilibrate with carbogen gas ,pH 7.4)

2. สารละลาย B : Collagenase buffer

collagenase type IV 0.08 % ในสารละลาย A ปริมาตร 50 ml และ 12.5 ml

3.สารละลาย C : Washing Medium ประกอบด้วย

3.1 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.26 mM ในสารละลาย A ปริมาตร 150 ml

3.2 เติม BSA 1.2 % ในสารละลายข้อ 3.1ในปริมาตร 100 ml และ 30 ml

4. สารละลาย D : Incubation Medium (Eagle's Basal Medium) 100 ml ประกอบด้วย

4.1 MEM 10 %	10.0	ml
4.2 L-glutamine (200 mM)	1.0	ml
4.3 BSA 1.2 %	1.2	g
4.4 $NaHCO_3$ (2.8 % w/v) ในน้ำกลั่น	10.0	ml

(ละลาย ในน้ำกลั่น 10 ml จากนั้นค่อยๆเติมจนได้ pH 7.4)

4.5 Distilled Water ให้ได้	100.0	ml

3.2.6.การเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาว (Preparation of Isolated Rat Hepatocytes) มีขั้นตอนดังนี้

1. ผ่าตัดเพื่อสอดแคนูลาเข้าสู่ portal vein ของหนูขาว ภายใต้การดมสลบด้วย ether

2. Two-steps perfusion : ปล่อย calcium free medium ไหลผ่านตับแบบไหลทิ้ง (nonrecirculating perfusion) ตัดตับออกจากตัวหนูแล้วใช้น้ำยา collagenase buffer ไหลผ่านตับแบบไหลเวียนซ้ำ (recirculating perfusion) เป็นเวลา 10 นาที

3. Disruption of collagenase - perfused liver : แกว่งให้เซลล์ตับหลุดเป็นอิสระใน collagenase buffer นำไปใส่ใน erlenmeyer flask (250 ml) ซึ่งให้ carbogen ตลอดเวลา เขย่าใน

metabolic shaker bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านผ้ากรองไนล่อน 2 ครั้ง

4. Purification of parenchymal cells : ปั่นแยก parenchymal cells แล้วล้างแขวนลอยเซลล์ใน washing medium 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ครั้งละ 30 วินาที เซลล์แขวนลอยขั้นสุดท้ายจะอยู่ใน incubation medium

5. Trypan blue exclusion test : ผสมเซลล์แขวนลอย 50 µl กับน้ำยา 0.4 % trypan blue 50 µl แล้วตรวจนับจำนวนเซลล์ใน counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

$$\% \text{ Trypan blue exclusion} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เป็น}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

เซลล์ตับอิสระที่มีค่า Trypan blue exclusion เกิน 86 % เท่านั้นจึงจะนำไปใช้ในการศึกษาทดลองต่อไป

6. Incubation of Isolated Hepatocyte Suspension : ในทุกการทดลองจะใช้เซลล์ตับอิสระแขวนลอย ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร /ตัวอย่าง incubate ใน erlenmeyer flasks ขนาด 25 มิลลิลิตร โดยให้ carbogen ตลอดเวลา เขย่าใน metabolic shaker bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7. การหาน้ำหนักเปียกของเซลล์ตับ (Wet weight) : ผลของค่าวัดส่วนใหญ่จะคำนวณต่อหน่วย wet weight นำเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่ทราบน้ำหนัก (2 ตัวอย่าง) ไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวลอยตัว (supernatant) ทิ้งแล้วคว่ำหลอดทดลองเป็นเวลา 2 ชั่วโมงนำไปชั่งหาน้ำหนักเฉลี่ย (mg ml^{-1})

การตรวจวัด cell membrane integrity

1. ตรวจวัด Alanine aminotransferase activity

ปั่นแยกเซลล์ตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แยกของเหลวลอยตัว ไปวัด transaminase activites (SGOT,SGPT) ตามวิธีของ Reitman และ Franbel (1975) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป (ดังกล่าวมาแล้วในการศึกษา in vivo)

2. ตรวจวัด Intracellular potassium (k^+)

นำตะกอนของเซลล์ (จากข้อ 1) เติม 3 % perchloric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำของเหลวลอยตัวไปตรวจวัด potassium โดยใช้ Atomic absorption spectrometer

การตรวจวัด Reduced glutathione (GSH)

ใช้วิธีการของ Ellman (1959) ซึ่งปรับปรุงโดย Jollow (1974) โดยนำเซลล์ตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 4% sulfosalicylic acid 0.5 มิลลิลิตร ปั่นเอาของเหลวลอยตัว 0.5 มิลลิลิตร ไปเติมสารละลาย 0.1 mM dithiobenzoic acid (ใน 0.1 M phosphate buffer pH 8) ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ GSH คำนวณจากค่า extinction coefficient ($1.36 \times 10^{-2}\ M^{-1} cm^{-1}$)

การตรวจวัดการเกิด Lipid peroxidation

ใช้ Thiobarbituric Acid Assay ตามวิธีการของ Buege และ Aust (1978) โดยนำเซลล์ตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย stock TCA-TBA-HCl (15 % Trichloroacetic acid และ 0.375 % Thiobarbitulic acid ใน 0.25 N Hydrochloric acid) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นแยกของเหลวลอยตัว ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำของเหลวลอยตัวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นคำนวณจากค่า extinction coefficient ($1.56 \times 10^{5}\ M^{-1} cm^{-1}$)

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1. การศึกษา in vivo แบ่งการศึกษาเป็น 2 ตอน ดังนี้

<u>ตอนที่ 1</u> ศึกษาขนาดของ VPU ที่ทำให้เกิดพิษต่อตับในหนูขาว

เป็นการศึกษาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของ VPU ที่ทำให้เกิดพิษต่อตับโดยแบ่งกลุ่มการศึกษา ดังนี้

1. Control : เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ
2. 1% MC : เป็นกลุ่มที่ได้รับ 1 % methyl cellulose po. 1 ครั้ง
3. VPU 700 : เป็นกลุ่มที่ได้รับ VPU ขนาด 700 mg/kg po. 1 ครั้ง
4. VPU 1,400 : เป็นกลุ่มที่ได้รับ VPU ขนาด 1,400 mg/kg po. 1 ครั้ง

<u>ตอนที่ 2</u> ศึกษาผลของเอ็นซัยม์อินดิวเซอร์ (inducer enzymes) ต่อการเกิดพิษต่อตับของ VPU ในหนูขาว

เมื่อได้ขนาดของ VPU ที่ทำให้เกิดพิษต่อตับแล้ว นำมาศึกษาผลของเอ็นซัยม์อินดิวเซอร์ (inducer enzymes) ต่อการเกิดพิษต่อตับของ VPU โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาดังนี้

1. Control : เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ
2. 1% MC : เป็นกลุ่มที่ได้รับ 1 % methyl cellulose po. 1 ครั้ง
3. Corn oil : เป็นกลุ่มที่ได้รับ corn oil po./วัน เป็นเวลา 7 วัน
4. VPU : เป็นกลุ่มที่ได้รับ VPU ขนาด 1,400 mg/kg po. 1 ครั้ง
5. PB : เป็นกลุ่มที่ได้รับ phenobarbital 80 mg/kg ip./วัน เป็นเวลา 4 วัน
6. CF : เป็นกลุ่มที่ได้รับ clofibric acid 100 mg/kg po./วัน เป็นเวลา 7วัน
7. VPU+PB : เป็นกลุ่มที่ได้รับ VPU ขนาด 1,400 mg/kg po. 1 ครั้ง และ ได้รับ phenobarbital 80 mg/kg ip./วัน เป็นเวลา 4 วัน ก่อนได้รับ VPU
8. VPU+CF : เป็นกลุ่มที่ได้รับ VPU ขนาด 1,400 mg/kg po. 1 ครั้ง และ ได้รับ clofibric acid 100 mg/kg po./วัน เป็นเวลา 7 วัน ก่อนได้รับ VPU

วิธีการทดลอง

1. เจาะเลือดหนูขาวทุกกลุ่มที่เวลา T (0) (ก่อนให้ intervention)

2. ให้ pre-treatment เป็นเวลา 4 วัน ทาง ip. และ po. (ในการศึกษาตอนที่ 2)

3. ป้อน VPU แก่หนูกลุ่มที่ต้องได้รับ VPU และป้อน 1 % methyl cellulose แก่หนูกลุ่มที่ต้องได้รับ 1 % methyl cellulose

4. เจาะเลือดหนูทุกกลุ่มที่เวลา T (1) ,T (2) และ T (3) (หลังให้ intervention 24 ,48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ)

5. ฆ่าหนูทุกกลุ่มภายหลังเจาะเลือด เพื่อตัดตับส่งตรวจชิ้นเนื้อตับทาง histopathology

6. ตรวจวัด activity ของเอ็นซัยม์ SGOT และ SGPT

หมายเหตุ สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มเท่ากับ 4 ตัว (n = 4) โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง

4.2. การศึกษา in vitro

เป็นการศึกษาในเซลล์ตับอิสระของหนูขาว เพื่อศึกษากลไกการเกิดพิษต่อตับของ VPU โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ตอน ดังนี้

<u>ตอนที่ 1</u> ศึกษาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของ VPU ที่ทำให้เกิดพิษ

โดยแบ่งกลุ่มการศึกษา ดังนี้

1. Control	ไม่ให้สารใด
2. DMSO	ให้ DMSO (55 mM) 10 µl (ใช้เป็น solvent ของ VPU)
3. VPU 1 mM	ให้ VPU ความเข้มข้น 1 mM 10 µl
4. VPU 2 mM	ให้ VPU ความเข้มข้น 2 mM 10 µl
5. VPU 3 mM	ให้ VPU ความเข้มข้น 3 mM 10 µl
6. VPU 4 mM	ให้ VPU ความเข้มข้น 4 mM 10 µl

วิธีการทดลอง

เมื่อแยกเซลล์ตับอิสระของหนูขาวแล้ว นำเซลล์ตับไป incubate ร่วมกับ VPU โดยการเปลี่ยนแปลงขนาดที่ให้คือ 1,2,3 และ 4 mM และ incubate นาน 1 และ 2 ชั่วโมงเมื่อครบตามเวลาแล้วจึงนำเซลล์ตับตัวอย่างมาตรวจหา activity ของเอนซัยม์ transaminase, intracellular K^+ และ GSH

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของเอนซัยม์อินฮิบิเตอร์ (inhibitor enzymes) ต่อการเกิดพิษของ VPU ในเซลล์ตับอิสระ

โดยแบ่งกลุ่มการศึกษา ดังนี้

1. Control	ไม่ให้สารใด
2. DMSO	ให้ DMSO (55 mM) 10 µl (ใช้เป็น solvent ของ VPU และ 4 - pentenoic acid)
3. 4PA 1 mM	ให้ 4 - pentenoic acid ความเข้มข้น 1 mM 10 µl
4. VPU 3 mM	ให้ VPU ความเข้มข้น 3 mM 10 µl
5. VPU+PA	ให้ VPU ความเข้มข้น 3 mM 10 µl และ 4 - pentenoic acid ความเข้มข้น 1 mM 10 µl
6. MP 1 mM	ให้ metyrapone ความเข้มข้น 1 mM 10 µl
7. VPU+MP	ให้ VPU ความเข้มข้น 3 mM 10 µl และ metyrapone ความเข้มข้น 1 mM 10 µl

วิธีการทดลอง

เมื่อได้ขนาดของ VPU ที่ทำให้เกิดพิษและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้เกิดพิษต่อตับแล้ว จึงศึกษาถึงผลของเอนซัยม์อินฮิบิเตอร์ (inhibitor enzymes) ต่อการเกิดพิษของ VPU โดยนำเซลล์ที่ได้มา incubate พร้อมกันกับ VPU และ เอนซัยม์อินฮิบิเตอร์ ได้แก่ 4 - pentenoic acid และ metyrapone ซึ่งเป็นเอนซัยม์อินฮิบิเตอร์ ที่จำเพาะต่อ β - oxidation และ ω - oxidation ตาม

ลำดับ และ incubate นาน 1 และ 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วจึงนำเซลล์ตัวอย่างมาตรวจวัด activity ของเอนซัยม์ transaminases, intracellular, K^+, GSH และ MDA

5. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การแสดงผลการทดลอง แสดงเป็น 2 ลักษณะ คือ

1.1 ตาราง

1.2 แผนภูมิแท่ง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

2.1 ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± SEM) ใช้ในการนำเสนอข้อมูลของพารามิเตอร์ทางชีวเคมี

2.2 Student's t-test สำหรับข้อมูลในกลุ่มเดียวกันที่เวลาต่างกัน

2.3 One-way analysis of variance หรือANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้โดย Duncan's new multiple range test สำหรับข้อมูลต่างกลุ่มที่มีมากกว่า 1 กลุ่ม ที่เวลาเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย