บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเกี่ยวกับการซึมผ่านและอันตรกิริยาของสารละลายตะกั่วอะซีเตทที่มีต่อเยื่อเซลล์เทียม

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1.1 เคมีภัณฑ์

1.1.1 แอลกอฮอล์ (Alcohol) (องค์การเภสัชกรรม)

1.1.2 Bovine Serum Albumin (E. Merck)

1.1.3 Cholesterol (E. Merck)

1.1.4 Disodium Hydrogen Phosphate (E. Merck)

1.1.5 Egg Lecithin (E. Merck)

1.1.6 Lead acetate (May & Baker Ltd.)

1.1.7 Monosodium Dihydrogen Phosphate (Riedel - De Haën AG Seelze-Hannover)

1.1.8 n-Hexane (BDH chemicals Ltd.)

1.1.9 Potassium Dichromate (May & Baker Ltd.)

1.1.10 Sulfuric Acid (May & Baker Ltd.)

1.1.11 น้ำกลั่น 3 ครั้ง (Tridistilled Water) (องค์การเภสัชกรรม)

1.2 เครื่องมือ

1.2.1 Agla Micrometer syringe (Wellcome Reagent Limited)

1.2.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcoholic Lamp)

1.2.3 Teflon Coated trough with Movable Barrier (CAHN Instrument)

1.2.4 Tensiometer (Biolar Cooperation)

1.2.5 Suction Pump (Tokyo Shibaura Electric Co., Ltd.)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมสารที่ใช้ในการสร้างเยื่อเซลล์เทียม (Langmuir, 1917; Adamson, 1960; Malcolm, 1965)

2.1.1 Bovine Serum Albumin Solution

ละลาย Bovine Serum Albumin 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 3 ครั้ง 25 มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายนี้ 0.0152 มิลลิลิตร (คิดเป็น 4 ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} ตารางแองสตรอม ($^{\circ}A^{2}$) มันจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

2.1.2 Egg Lecithin Solution

ละลาย Egg Lecithin 5 มิลลิกรัม ใน n-Hexane 25 มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายนี้ 0.026887 มิลลิลิตร (คิดเป็น 4 ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} ตารางแองสตรอม มันจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

2.1.3 Cholesterol Solution

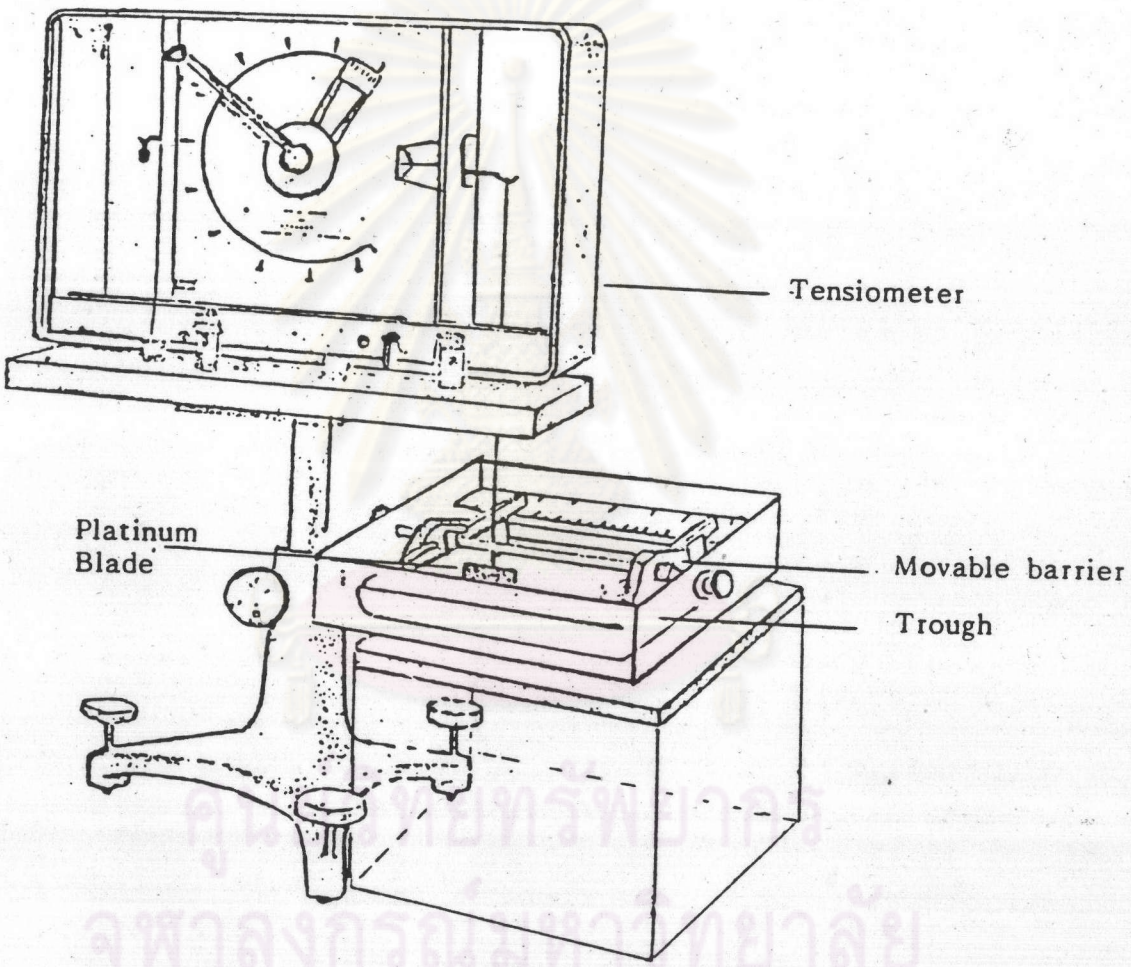
ละลาย Cholesterol 5 มิลลิกรัม ใน n-Hexane 25 มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายนี้ 0.0195235 มิลลิลิตร (คิดเป็น 4 ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} ตารางแองสตรอม มันจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

2.2 <u>การวัดแรงตึงผิวของ น้ำกลั่น 3 ครั้ง (Tridistilled Water) pH 3 และ 8</u>

2.2.1 เตรียม น้ำกลั่น 3 ครั้ง ให้มี pH 3 และ 8 โดยใช้ Sorensen's Phosphate Buffer (Chase et al., 1970) เพื่อเป็น Subphase ในการเตรียมเยื่อเซลล์เทียม

2.2.2 วัดแรงตึงผิวของน้ำกลั่น 3 ครั้ง pH 3 และ 8 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะอาหารและลำไส้ตามลำดับ โดยวิธี Wilhelmy Plate Method (วิลาวัณย์ พิเชียรเสถียร, 2523; Felmeister, 1972)

การวัดแรงตึงผิว กระทำโดยใช้เครื่องมือ Surface Tensiometer (ดังแสดงในรูปที่ 17) ซึ่งประกอบด้วย Torsion Balance และมีแผ่นแพลตินัม (Platinum Blade) แขวนอยู่ บรรจุน้ำที่ต้องการวัดแรงตึงผิวลงในถาดให้เต็มพอดี ปรับระดับน้ำด้วย Suction Pump ถาดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงพื้นที่ผิวหน้าได้ด้วยแผ่นกั้นที่เคลื่อนที่ได้ (Movable Barrier) โดยมีสเกลที่มีหน่วยเป็นเซนติเมตรติดอยู่ ความยาวของสเกล 10 เซนติเมตร คิดเป็นพื้นที่ของผิวหน้า (Surface Area) 100% จากนั้นปรับแผ่นแพลตินัม จุ่มลงในน้ำในถาด โดยให้ขอบบนของแผ่นแพลตินัมอยู่ใต้ผิวน้ำพอดีซึ่งเข็มที่หน้าปัทม์ของ Surface Tensiometer จะอยู่ตรงขีดที่กำหนดให้ ที่จุดนี้จะต้องปรับค่าแรงตึงผิวบนหน้าปัทม์ให้เป็นศูนย์ด้วย เมื่อต้องการจะวัดแรงตึงผิวของน้ำให้ค่อย ๆ เพิ่มค่าที่หน้าปัทม์ ขณะเดียวกันแผ่นแพลตินัม จะถูกยกขึ้นจากน้ำ เข็มซึ่งเป็นตัวปรับระดับของแผ่นแพลตินัม จะเคลื่อนขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อแผ่นแพลตินัมถูกยกขึ้นจากน้ำจนกระทั่งขอบบนถูกยกขึ้นเหนือผิวน้ำ เข็มจะเคลื่อนเร็วขึ้นกว่าเดิม ณ จุดนี้ค่าที่อ่านได้จากหน้าปัทม์ จะเป็นค่าแรงตึงผิวของน้ำซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม (mg.) เมื่อนำมาคูณด้วย 0.198 จะได้ค่าที่มีหน่วยเป็น ไดน์/เซนติเมตร (dyne/cm) Torsion Balance นี้สามารถวัดแรงตึงผิวที่เปลี่ยนแปลงได้ถึง 0.0396 ไดน์/เซนติเมตร



รูปที่ 17 เครื่องมือวัดแรงดึงผิวพร้อมด้วยถาดและที่กั้นซึ่งเคลื่อนที่ได้

2.3 การสร้างเยื่อเซลล์เทียม

ใช้หลักการสร้างเยื่อเซลล์เทียมตามวิธีของ Langmuir (Langmuir, 1917) ซึ่งการสร้างเยื่อเซลล์เทียมทุกครั้งต้องทดสอบความสะอาดของผิวน้ำในถาดที่เป็น Subphase ก่อนโดยการวัดแรงตึงผิวของน้ำที่เป็น Subphase ในพื้นที่ผิว 100% และ 30% ถ้าผิวหน้าของน้ำในการศึกษา ดังกล่าว สะอาด ค่าที่วัดได้จะต้องเท่ากัน ถ้าไม่สะอาดให้ใช้วิธี Suction ดูดน้ำบริเวณผิวหน้าออกจนกว่าจะสะอาดแล้วปรับระดับน้ำในถาดใหม่จนกว่าจะวัดแรงตึงของน้ำที่จุดต่าง ๆ ได้เท่ากัน จึงเริ่มสร้างเยื่อเซลล์เทียม โดยใช้สารละลายที่เตรียมไว้ดังข้อ 2.1 มาหยดลงบน Subphase pH 3 และ 8 เพื่อสร้างเยื่อเซลล์เทียมในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4

การสร้างเยื่อเซลล์เทียมในแต่ละอัตราส่วนกระทำโดยใช้ Agla Micrometer Syringe ในการหยดสารละลายต่าง ๆ ลงบน Subphase ค่าที่อ่านได้จาก Agla Micrometer Syinge เป็นระยะทางที่ลูกสูบไมโครมิเตอร์ (Micrometer Spindle) ถูกดันเข้าไปในกระบอกสูบ (Barrel) ซึ่งสามารถคำนวณเป็นปริมาตรของสารละลายที่หยดลงบน Subphase ได้จากสูตรดังนี้

$$20\,M = V$$

เมื่อ M = ค่าที่อ่านได้จากไมโครมิเตอร์ไซริงค์ (Micrometer Syringe)

V = ปริมาตรของสารละลายเป็นไมโครลิตร (Microliter, ul)

ดังนั้น เมื่อจะใช้ Egg Lecithin Solution จำนวน 0.02688 มิลลิลิตร ต้องใช้จำนวน 1.344 ช่อง ของ Micrometer Syringe หรือหมุนด้าม (Holder) ไป 2 รอบ กับอีก 34.4 ขีด เนื่องจาก 1 รอบ มีปริมาตรสารละลายเท่ากับ 10 ไมโครลิตร (วิธีใช้ ไมโครมิเตอร์ไซริงค์แสดงในภาคผนวก ก.) ซึ่งวิธีคำนวณปริมาตรสารละลายอื่น ๆ เป็นไปในทำนองเดียวกัน

การหยดสารละลายลงบน Subphase นั้นให้ถือไมโครมิเตอร์ไซริงค์สูงเหนือผิวน้ำประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แล้วจึงหยดสารละลาย

ลงช้า ๆ ขณะที่หยดสาร แผ่นแพลตินัมจะต้องอยู่ในใต้ผิวน้ำโดยที่ขอบบนของแผ่นแพลตินัมอยู่ที่ระดับผิวน้ำพอดี

เมื่อหยดสารละลาย Egg Lecithin Solution (ตามปริมาณที่ต้องการในแต่ละอัตราส่วนของเยื่อเซลล์เทียม) ลงบน Subphase แล้วทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ n-Hexane ระเหยหมด และ Egg Lecithin เรียงตัวเป็นระเบียบ แล้วจึงหยดสารละลาย Cholesterol Solution (ตามปริมาณที่ต้องการในแต่ละอัตราส่วนของเยื่อเซลล์เทียม) ตามลงไปแล้วทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ n-Hexane ระเหยออกหมด แล้วจึงหยดสารละลาย Bovine Serum Albumin Solution ในปริมาณที่ต้องการในแต่ละอัตราส่วนแล้วทิ้งไว้ 10 นาที เช่นกัน ทั้งนี้เพื่อให้โปรตีนเรียงตัวให้เป็นระเบียบ จากนั้นเริ่มวัดแรงตึงผิวที่ 100% ของผิวหน้า (Surface area) แล้วค่อยๆ ลดพื้นที่ผิวหน้าลงเรื่อย ๆ โดยใช้แผ่นกั้นที่เคลื่อนที่ได้ และทำการวัดแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ (Malcolm, 1965; Felmeister, 1972) ควรวัดแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ลดพื้นที่ผิวหน้าลงจนกว่าแรงตึงผิวจะไม่ลดลงหรือเปลี่ยนแปลง ซึ่งแสดงว่าเยื่อเซลล์ (Film) จะเรียงตัวไม่เป็นระเบียบและเสียไป (Collapsing Point) นำค่าที่วัดได้ในแต่ละพื้นที่มาสร้าง π -A Curve (Surface Pressure - Surface Area Curve) โดยที่ค่า คิดจากสูตรคำนวนดังนี้ คือ

$$\pi = r_o - r$$

เมื่อ π = ความดันผิว (Surface Pressure)

r_o = แรงตึงผิวของน้ำหรือ Subphase

r = แรงตึงผิวที่วัดได้หลังจากมีเยื่อเซลล์เทียมหรือแรงตึงผิวที่วัดได้หลังจากมีเยื่อเซลล์เทียมและสารที่ต้องการศึกษาวิจัย

การวัดแรงตึงผิว 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย นั้น ในการวัดแต่ละครั้งต้องเตรียม Subphase และเยื่อเซลล์เทียมใหม่ทุกครั้ง เนื่องจากภายหลังจากที่เยื่อเซลล์แตกตัว (Film Collapse) แล้ว เยื่อเซลล์เทียมนั้นจะเสียไป จึงทำการวัดซ้ำใหม่ เพื่อยืนยันผลไม่ได้เพราะค่าแรงตึงผิวจะคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง

ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนของสารละลาย Egg Lecithin Solution, Cholesterol Solution และ Bovine Serum Albumin Solution ในการสร้างเยื่อเซลล์เทียมอัตราส่วนต่าง ๆ

Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin	Egg Lecithin Solution : Cholesterol Solution : Bovine Serum Albumin Solution
1 : 3 : 4	6.7217 : 14.6426 : 15.1999 ไมโครลิตร
1 : 3 : 0	6.7217 : 14.6426 : 0 ไมโครลิตร
2 : 2 : 4	13.4435 : 9.7617 : 15.1999 ไมโครลิตร
2 : 2 : 0	13.4435 : 9.7617 : 0 ไมโครลิตร
3 : 1 : 4	20.1652 : 4.8808 : 15.1999 ไมโครลิตร
3 : 1 : 0	20.1652 : 4.8808 : 0 ไมโครลิตร
4 : 0 : 4	26.887 : 0 : 15.1999 ไมโครลิตร
4 : 0 : 0	26.887 : 0 : 0 ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 <u>ศึกษาผลของสารละลายตะกั่วอะซีเตทต่อเยื่อเซลล์เทียม(แทนเยื่อเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้)</u>

2.4.1 เตรียมสารละลายตะกั่วอะซีเตท

เตรียมสารละลายตะกั่วอะซีเตทโดยละลายสารตะกั่วอะซีเตท 2 กรัม ในน้ำกลั่น 3 ครั้ง 100 มิลลิลิตร แล้วคำนวณปริมาตรของสารละลายตะกั่วอะซีเตทที่ต้องการจะหยดลงบน Subphase จากสูตรคำนวณ 20 M = V ในการนี้ต้องการสารละลายตะกั่วอะซีเตท 5 ปริมาณดังนี้คือ 200 ไมโครกรัม, 250 ไมโครกรัม, 300 ไมโครกรัม,350 ไมโครกรัม และ 400 ไมโครกรัม

2.4.2 ศึกษาผลของสารละลายตะกั่วอะซีเตท ที่มีต่อเยื่อเซลล์เทียมที่ pH 3 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่าง เฉลี่ย ณ บริเวณกระเพาะอาหาร

สร้างเยื่อเซลล์เทียมตามวิธีในข้อ 2.3 บน Subphase (น้ำกลั่น 3 ครั้งที่มี pH 3) แล้วหยดสารละลายตะกั่วอะซีเตท ในแต่ละปริมาณลงบนเยื่อเซลล์เทียมทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นวัดแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลงไปจาก 100% แล้วลดพื้นที่ลงเรื่อย ๆ จนกว่าแรงตึงผิวจะไม่ลดลงหรือเปลี่ยนแปลงต่อไปอีก (Malcolm, 1965; Felmeister, 1972) นำค่าแรงตึงผิว ที่วัดได้มาสร้าง π - A Curve (Surface pressure - Surface area curve) โดยเปรียบเทียบกับ π - A Curve ของเยื่อเซลล์เทียมที่ไม่หยดสารละลายตะกั่วอะซีเตทในระบบเดียวกัน วัดค่าแรงตึงผิว 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาสร้าง π - A Curve ตามที่ต้องการ

2.4.3 ศึกษาผลของสารละลายตะกั่วอะซีเตท ที่มีต่อเยื่อเซลล์เทียมที่ pH 8 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่าง เฉลี่ย ณ บริเวณลำไส้

สร้างเยื่อเซลล์เทียมตามวิธีในข้อ 2.3 บน Subphase (น้ำกลั่น 3 ครั้งที่มี pH 8) แล้วทำการศึกษาในทำนองเดียวกันกับข้อ 2.4.2 โดยหยดสารละลายตะกั่วอะซีเตทในแต่ละปริมาณลงบนเยื่อเซลล์เทียม ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที หลังจากนั้น วัดแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลงไปจาก 100%

แล้วลดพื้นที่ลงเรื่อย ๆ จนกว่าแรงตึงผิวจะไม่ลดลงหรือเปลี่ยนแปลงต่อไปอีก นำค่าแรงตึงผิวที่วัดได้มาสร้าง π - A Curve โดยเปรียบเทียบกับ π - A Curve ของเยื่อเซลล์เทียมที่ไม่ได้หยดสารละลายตะกั่วอะซิเตท ในระบบเดียวกัน ในการวัดค่าแรงตึงผิวทำการวัดอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยเช่นกันจากนั้นนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาสร้าง π - A Curve ตามที่ต้องการ

นำผลการศึกษาในข้อ 2.4.2 และ 2.4.3 มาเปรียบเทียบกันเพื่อประเมินผลสารละลายตะกั่วอะซิเตทต่อเยื่อเซลล์เทียมทั้งในด้านผลปริมาณสารละลายตะกั่วอะซิเตท องค์ประกอบของเยื่อเซลล์เทียมตลอดจนกระทั่งสภาวะความเป็นกรด-ด่างของ Subphase (วิลาวัณย์ พิเชียรเสถียร, 2523; Feimeister, 1972)

3. <u>การประเมินผลความสามารถการซึมผ่านและอันตรกิริยาต่อเยื่อเซลล์เทียม(แทนเยื่อเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้)ของสารละลายตะกั่วอะซิเตท</u>

การประเมินผลความสามารถการซึมผ่านและอันตรกิริยาต่อเยื่อเซลล์เทียม(แทนเยื่อเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้)ของสารละลายตะกั่วอะซิเตทนี้ ประเมินผลจากการเปรียบเทียบ Surface Pressure - Surface Area (π - A) Curves ของเยื่อเซลล์เทียมที่ยังไม่ได้หยดสารละลายตะกั่วอะซิเตทกับที่หยดสารละลายตะกั่วอะซิเตทในปริมาณต่าง ๆ ตามที่กำหนดไว้ข้างต้น โดยมีวิธีวิเคราะห์ดังนี้คือ

3.1 เปอร์เซนต์ของพื้นที่ของเยื่อเซลล์เทียม (% Surface area at collapsing point) ถ้าแตกต่างกันไม่เกิน 5% แสดงว่า สารในปริมาณดังกล่าวนั้นสามารถซึมผ่านเยื่อเซลล์เทียมได้ดี แต่ถ้าแตกต่างกันเกิน 5% แสดงว่าสารในปริมาณดังกล่าวนั้นสามารถผ่านเยื่อเซลล์เทียมได้บ้างและมีเหลือตกค้างอยู่ที่ผิวซึ่งอาจจะเกิดอันตรกิริยากับส่วนประกอบของเยื่อเซลล์เทียมได้ เปอร์เซนต์พื้นที่ของการแตกของเยื่อเซลล์เทียมยิ่งแตกต่างกันมากเท่าไรก็แสดงว่าสารในปริมาณดังกล่าวนั้นสามารถซึมผ่านเยื่อเซลล์เทียมได้น้อยลงและมีอันตรกิริยาสูงมากขึ้นเท่านั้น

3.2 ค่าความดันหรือค่าแรงตึงผิว (Surface pressure) ที่จุดซึ่งฟิล์มแตกที่พื้นที่เดียวกันของสารชนิดเดียวกัน ถ้าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P > 0.05$ แสดงว่า สามารถซึมผ่านเยื่อเซลล์เทียมได้พอ ๆ กัน แต่ถ้า

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ แสดงว่า สารในปริมาณนั้นซึมผ่านได้ไม่หมดและมีบางส่วนเหลือตกค้างอยู่ที่ผิวของเยื่อเซลล์เทียม (สถิติที่ใช้ทดสอบค่านัยสำคัญทางสถิติคือ Student's t-test)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิจัยเกี่ยวกับผลของสารละลายตะกั่วอะซีเตทต่อเยื่อเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้ของสัตว์ทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูแรท (Rat) สีขาว พันธุ์วิสตาร์ (Wistar) เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 250-300 กรัม ซึ่งสั่งมาจากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล (National Laboratory Animal Center, Mahidol University) หนูที่ใช้ในการทดลองนี้แยกเลี้ยงในกรงสะอาด กรงละ 5 ตัว โดยให้อาหารและน้ำเพียงพอแก่ความต้องการ (อาหารที่ใช้เลี้ยงหนูสั่งมาจาก Purina Laboratory Chow, Premium quality feed, Zueling, Gold Coin Mills Pte, Ltd., Singapore ส่วนน้ำที่ใช้เลี้ยงหนู คือ น้ำประปา) ห้องที่เลี้ยงหนูต้องสะอาด โปร่ง อากาศถ่ายเทดี มีอุณหภูมิห้องเฉลี่ยอยู่ในช่วง 25 °ซ - 32 °ซ มีแสงสว่างภายในห้องในช่วง 06.00 น. - 19.00 น. และมืดในช่วง 19.00 น. - 06.00 น.

2. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1 Diethyl ether (E. Merck)
2.2 น้ำกลั่น (Distilled Water) (คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
2.3 Disodium Hydrogen Phosphate (E. Merck)
2.4 38% Formalin (วิทยาศรม)
2.5 Lead acetate (May & Baker Ltd.)
2.6 Monosodium Dihydrogen Phosphate (Riedel - De Haën AG Seelze - Hannover)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาผลชนิดปัจจุบัน (Acute) ของสารละลายตะกั่วอะซีเตทต่อเยื่อเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้ของหนู

การทดลองนี้แบ่งหนูทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มควบคุม (Control Group) จำนวน 5 ตัว กลุ่มนี้จะถูกป้อนน้ำกลั่น (Distilled Water) 1 มิลลิลิตร วันละ 1 ครั้ง ด้วยหลอดสำหรับป้อนอาหาร (Feeding Tube) นอกเหนือจากการให้อาหารและน้ำตามปกติเพียง 1 วัน ในช่วงเวลา 07.00 น. ถึง 09.00 น.

- กลุ่มทดลอง (Experimental Group) จำนวน 25 ตัว โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยกลุ่มละ 5 ตัวหนูแต่ละตัวในแต่ละกลุ่มจะถูกป้อนสารละลายตะกั่วอะซีเตท ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 200,250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักตัว 70 กิโลกรัม ผสมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร วันละ 1 ครั้ง (ด้วย Feeding Tube) นอกเหนือจากการให้อาหารและน้ำตามปกติเพียง 1 วัน ในช่วงเวลา 07.00 น- 09.00 น.

24 ชั่วโมงภายหลังการป้อนสารดังกล่าวให้นำหนูทั้ง 2 กลุ่ม มาเปิดช่องท้องแยกกระเพาะอาหารและลำไส้เพื่อศึกษาลักษณะของเยื่อเซลล์ผนังกระเพาะอาหารและลำไส้ทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ (Histology)

3.2 <u>ศึกษาผลชนิดเกือบปัจจุบัน (Subacute) ของสารละลายตะกั่วอะซีเตทต่อเยื่อเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้ของหนู</u>

การทดลองนี้กระทำในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.1 แต่จะมีหนูกลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่หนึ่ง จะถูกป้อนสารละลายตะกั่วอะซีเตท วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน ติดต่อกัน นอกเหนือจากการให้อาหารและน้ำตามปกติ

- กลุ่มที่สอง จะถูกป้อนสารละลายตะกั่วอะซีเตท วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน ติดต่อกัน นอกเหนือจากการให้อาหารและน้ำตามปกติ

24 ชั่วโมงภายหลังการป้อนสารดังกล่าวให้นำหนูทั้ง 2 กลุ่ม มาเปิดช่องท้อง แยกกระเพาะอาหารและลำไส้เพื่อศึกษาลักษณะของเยื่อเซลล์ผนัง

กระเพาะอาหารและลำไส้ทางด้านจุลกายวิภาคศาตร์ (Histology)

3.3 <u>การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางจุลกายวิภาคศาตร์</u>

ใช้อีเธอร์ทำให้หนูสลบ แล้วจึงเปิดช่องท้อง รีบแยกกระเพาะอาหารและลำไส้ออกมาทันทีแล้วล้างด้วย 0.9% NaCl เพื่อชำระล้างเลือดและสิ่งสกปรกออก จากนั้นจึงแช่กระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนที่ต้องการศึกษาคือ กระเพาะอาหารส่วนกลาง (Body) และลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) ลงใน 10% Normal Buffered Formalin (ในปริมาณ 10-20 เท่าของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษา) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อดังกล่าวผ่านแอลกอฮอล์ในขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จาก 70%, 80%, 95%, และ 100% ด้วยวิธี Alcohol Processing ก่อนจะนำไปแช่ใน xylol 2 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อดังกล่าวผ่านกรรมวิธีฝังในพาราฟิน (Paraffin Embeded) แล้วตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางมีความหนาขนาด 5 ไมครอน (μ) ด้วยเครื่องมือตัดชิ้นเนื้อเยื่อคือ ไมโครโตม (Microtome) หลังจากนั้นนำแผ่นเนื้อเยื่อดังกล่าวมาย้อมสีด้วย Haematoxylin และ Eosin (ดังแสดงในภาคผนวก ข.) ก่อนจะนำไปศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Light Microscope)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย