บทที่ 2

สารเคมี-อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

- หนูขาว เพศผู้ พันธุ์วิสตาร์ (wistar)
- น้ำหนักระหว่าง 200-260 กรัม
- จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

2. สารเคมีและเครื่องมือ

- สารเคมีที่ต้องการศึกษา คือ (+)-usnic acid ถูกสกัดมาจากฝอยลม (*Usnea siamensis* Wainio) ในห้องปฏิบัติการเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

- บริษัท คลินิคอลไดแอคโนติคส์ ประเทศไทย
  SGOT (AST) & SGPT (ALT) Sets
- บริษัท อี เมอร์ค ประเทศเยอรมันนี
  Carbontetrachloride
  Diethylether
  Hydrochloric acid
- บริษัท ลีโอ ฟาร์มาซูติคัล ประเทศเดนมาร์ค
  Heparin 5,000 IU/ml
- บริษัท ซิกม่า เคมีคัล ประเทศสหรัฐอเมริกา
  Aminopyrine

Ammonium acetate

Aniline hydrochloride

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

Calcium chloride

Collagenase (Type IV)

D-gluconic acid

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

5,5-Dithiobenzoic acid

L-glutamine

Magnesium sulfate

Minimum Essential Medium Eagle (MEM)

Phenol

Potassium phosphate (monobasic)

Potassium chloride

Semicarbazide hydrochloride

Sodium bicarbonate

Sodium carbonate

Sodium chloride

Sodium phosphate (dibasic, monobasic)

Sulfosalicylic acid

2-Thiobarbituric acid

Trichloroacetic acid

Trizma base (Tris (hydroxymethyl) aminomethane)

Trypan blue solution 0.4%

- บริษัท ไทยอินดัสเตรียลแก๊ส

Carbogen gas (O_2 95%, CO_2 5%)

- ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4)

- เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

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

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

Counting chamber (Neubauer, bright-line)

Dissecting instruments

Disposible insulin 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)

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

Operation table

pH meter (Backman Instruments, USA)

Single pan balance (Sartorious 1213 MP, Geramany)

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. สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเตรียมสารในการวิจัยและวิธีการทดลอง

การศึกษา in vivo

1. การเตรียม (+)-usnic acid suspension

นำ (+)-usnic acid ละลายใน DMSO ตามขนาดที่ต้องการศึกษา ทำการฉีดเข้าช่องท้องหนูขาว (ip) ในขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบตามกำหนดเวลาดังกล่าว ทำการตรวจวัด activity ของเอ็นไซม์ SGOT & SGPT และตัดตับเพื่อส่งตรวจทาง histopathology (Transmission electron microscope : TEM)

2. การวิเคราะห์ activity ของเอ็นไซม์ SGOT & SGPT

เป็นการตรวจวัด cell membrane integrity โดยอาศัยการตรวจวัด transaminase activity ตามวิธีการของ Raiman and Franbel (1957) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป มีรายละเอียดดังนี้

: การทำ standard curve โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ standard pyruvate และ GOT & GPT substrates ดังนี้

1. การทำ standard curve โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ pyruvate และ GOT & GPT substrates ดังนี้

Tube no.	Standard pyruvate (ml)	GOT & GPT substrates (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

2. เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 ml ทุกหลอดทดลอง ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

3. เติม 0.4 N NaOH 5 ml ทุกหลอดทดลอง ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

4. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set 0

5. plot curve ระหว่าง GOT และ GPT units กับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละค่า

6. ลากเส้นต่อของแต่ละจุดจะได้ standard curve

: การวิเคราะห์ activity ของ SGOT & SGPT มีขั้นตอนดังนี้

การศึกษา in vivo ทำการเตรียมซีรั่มเพื่อตรวจวัดเอ็นไซม์ SGOT & SGPT

- สลบหนูขาวด้วย diethylether
- ผ่าตัดเปิดหน้าท้องและทำการ draw เลือดจาก inferior vena cava โดยใช้หลอดฉีดยา ให้ได้ 2 ml
- นำไปใส่ในหลอดทดลองและแช่ใน ice bath
- นำไป centrifuge ที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- แยกส่วนใสที่เป็นซีรั่มใส่ใน microtube และแช่ในน้ำแข็งเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ 4 องศาเซลเซียส ถ้ายังไม่นำไปวิเคราะห์ควรเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้ประมาณ 3-5 วัน โดยที่ไม่ทำให้ activity ของ SGOT & SGPT เปลี่ยนแปลง (วัชราภรณ์ ปัชชามาตย์, 2539)

นำส่วนของซีรั่มมาตรวจวัดเอ็นไซม์ตามขั้นตอน ดังนี้

1. ใส่ GOT & GPT substrates 0.5 ml ในหลอดทดลองทุกหลอด
2. นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
3. เติมซีรั่มที่เก็บใน microtube 0.1 ml/ตัวอย่าง (ทำให้เจือจางด้วยน้ำในอัตรา 1:10) ผสมและนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับ SGOT และเป็น

เวลา 15 นาที สำหรับ SGPT

4. เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 ml ทุกหลอดทดลอง ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

5. เติม 0.4 N NaOH 5 ml ทุกหลอดทดลอง ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set 0

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหา activity ของ SGOT & SGPT จาก standard curve จะได้ค่า SGOT & SGPT ในซีรั่ม

สิ่งที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์

- hemolyzed serum อาจทำให้ได้ค่าที่สูงกว่าความเป็นจริง เนื่องจากเม็ดเลือดมีเอ็นไซม์ GOT เป็น 15 เท่า และ GPT เป็น 7 เท่า เมื่อเทียบกับซีรั่ม

- lipidemia serum จะทำให้ค่าที่ได้ผิดไป เนื่องจากความขุ่น

- ซีรั่มควรแยกภายใน 2 ชั่วโมง นับตั้งแต่ draw เลือดออกมาจาก inferior vena cava และควรเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ถ้ายังไม่ทำการตรวจวัดทันที

- ควรให้ทุกหลอดมีช่วงเวลาที่ทำปฏิกริยาเท่ากันทุกครั้ง

3. การเตรียมชิ้นเนื้อตับหนูขาวเพื่อส่งตรวจทาง histopathology (TEM)

เตรียม 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4) ลงในขวดใส่ชิ้นเนื้อ 5 มิลลิลิตร สำหรับแช่ชิ้นเนื้อตับเพื่อส่งตรวจทาง histopathology หลังจากนั้นดมสลบหนูขาวด้วย diethylether ผ่าตัดเปิดหน้าท้องแล้วตัดตับหนูขาว นำมาล้างในน้ำเกลือ (normal saline) อย่างรีบด่วน หลังจากนั้นให้ตัดตับเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1x1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (สุ่มตัวอย่างจากตับแต่ละ lobe) นำไปในใส่ขวดที่มี 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4) ซึ่งได้ label ไว้แล้ว

การตรวจทาง histopathology เป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่สามารถบ่งชี้ถึงพยาธิสภาพของเซลล์ตับ เมื่อได้รับสารที่อาจทำลายต่อเซลล์ตับ ในการวิจัยนี้ได้ส่งชิ้นเนื้อตับที่ได้จากการทดลองที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเตรียมชิ้นเนื้อตับในรูปของ grid และทำการแปลผลทาง histopathology โดย ศ. นพ. วีระ กสานติกุล ภาควิชาพยาธิวิยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจทาง histopathology (TEM) มีเทคนิคและขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

1. การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection)

ตัวอย่าง หรือ ชิ้นเนื้อที่ได้จากพืชหรือสัตว์ จะต้องนำไปตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ และรีบดองหรือเก็บรักษา (fixation) ในน้ำยาหรือสารละลายเคมีที่ใช้ (fixative) ทันที ตัวอย่างจากสัตว์ควรต้องล้างในน้ำเกลือ (normal saline) อย่างรีบด่วนเสียก่อน จึงจะนำไปใส่ใน fixative ทั้งนี้เพื่อช่วยให้มีการ fixation ที่ดีขึ้นโดยไม่มีของเหลวอื่นๆ จากชิ้นเนื้อ เช่น เลือด มาทำให้ fixation ด้อยในด้านคุณภาพ ขนาดชิ้นเนื้อควรจะไม่หนากว่า 3 มิลลิเมตร

2. การดอง (Fixation)

ทันทีที่ชิ้นเนื้อได้รับการปฏิบัติขั้นต้นแล้ว ควรจะต้องใส่ใน fixative พร้อมทั้งหั่นให้เป็นชิ้นเล็กด้วยใบมีดคมและสะอาด โดยมีขนาดไม่โตกว่า 1x1x1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ระยะเวลาของการดองใน fixative เพื่อรักษาลักษณะของตัวอย่างให้ใกล้เคียงกับสภาพความเป็นจริงมากที่สุด ขึ้นอยู่กับชนิดของ fixative

3. การขจัดน้ำออก (Dehydration)

โดยการแทนที่น้ำด้วยสารละลายเคมีที่มีคุณสมบัติในการขจัดน้ำออก สารละลายเคมีนี้เรียกว่า สารขจัดน้ำออก (dehydrant) ซึ่งเป็นพวก ethyl alcohol หรือบางครั้งใช้ acetone โดยเริ่มจากสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ (มีน้ำอยู่มาก) จนสิ้นสุดที่สารละลายที่มีความเข้มข้น

สูงหรือสารเหลวบริสุทธิ์ที่ปราศจากน้ำ ชุดของสารละลายที่ทำหน้าที่เป็น dehydrant ประกอบด้วย ชุดอนุกรมจากความเข้มข้นต่างกัน อาจเป็น 35%, 70%, 95% และ 100% ตามลำดับ

4. การนำเอาตัวกลางเข้าแทนที่น้ำ (Infiltration)

เป็นขั้นตอนการทำเพื่อทำให้ตัวกลางที่จะยึดองค์กรต่างๆ ภายในตัวอย่างมีความคงทนและเหมาะสมที่จะตัดให้บาง เริ่มจากการแทนที่ dehydrant ด้วยสารละลายเคมีที่สามารถเข้ากันได้กับ dehydrant และตัวกลางประเภทปลาสติก โดยดูดเอา absolute alcohol ออกและเติม propylene oxide เพื่อให้เข้าไปแทนที่ alcohol สักระยะหนึ่ง หลังจากนั้นก็แช่ตัวอย่างในส่วนผสมของ propylene oxide และปลาสติกอย่างละเท่าๆ กัน เพื่อให้ปลาสติกค่อยๆ ซึมเข้าสู่ภายในตัวอย่างและแทนที่ propylene oxide จากนั้นถ่ายตัวอย่างลงสู่ปลาสติกล้วนๆ ก่อนจะทำให้ปลาสติกแข็งตัว

5. การฝังตัวอย่างในตัวกลาง (Embedding)

ตัวอย่างที่ผ่าน infiltration แล้ว จะต้องนำไปทำเป็นแท่งโดยฝังในปลาสติกหรือตัวกลางที่ต้องการใช้ทำเป็นบล๊อกหรือแท่งเพื่อการตัด ตัวกลางนี้เรียกว่า embedding media ซึ่งมีลักษณะเหลวในขั้นต้น เมื่อทิ้งไว้สักระยะหนึ่งหรือเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น จะกลายเป็นของแข็งที่มีความเหมาะสมต่อการตัดให้บางได้

6. การทำให้ตัวกลางแข็งตัว (Polymerization)

เป็นการอบปลาสติกที่มีตัวอย่างฝังอยู่ ในตู้อบที่อุณหภูม 60 องศาเซลเซียส (ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน) แล้วนำไปตัดหรือเฉือนเอาปลาสติกที่มากเกินพอออกและจัดให้หน้าตัดของตัวอย่างที่ฝังในปลาสติกมีขนาดเหมาะสม (0.1-0.2 มิลลิเมตร) เพื่อสะดวกและง่ายต่อการตัดให้บาง

7. การตัดตัวอย่าง (Sectioning)

ตัดตัวอย่างด้วยเครื่องตัดชนิดพิเศษ (ultramicrotome) ใช้มีดแก้วหรือมีดเพชร ให้มีความหนาระหว่าง 60-90 นาโนมิเตอร์ ตัวอย่างบางนี้ (section) จะลอยอยู่ในช่องบรรจุน้ำที่ติดอยู่กับมีดและถูกวางบนแผ่นวางตัวอย่าง (grid) ซึ่งทำด้วยแผ่นตาข่ายทองแดงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 3.05 มิลลิเมตร

8. การย้อม (Staining)

เป็นการทำให้ตัวอย่างที่บางพิเศษ มีความขาวจัด ดำจัด หรือมี contrast เพิ่มขึ้น โดยการจุ่มตัวอย่างที่ติดอยู่บน grid ลงในสารละลายของโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว ยูเรเนี่ยม ฯลฯ อันจะทำให้ส่วนต่างๆ ของตัวอย่างมีลักษณะทึบต่อลำแสงอิเล็กตรอน ซึ่งให้ผลออกมาเป็นภาพหลังจากได้นำไปส่องดูด้วย TEM (transmission EM) (เวคิน นพนิตย์, 2524 ; 2528)

การศึกษา in vitro

1. การเตรียม (+)-usnic acid suspension

นำ (+)-usnic acid ละลายใน DMSO ตามความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา คือ 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} และ 10^{-2} M

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาว

การเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาวใช้วิธีของ Berry and Friend (1969) ต่อมา Stacey and Priestly (1978) ได้ทำการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมกับอุปกรณ์ที่มีอยู่ โดยใช้ Modified Kreb's and Henseleit Physiological Solution 1932 ซึ่งจะให้แก๊ส carbogen และอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตลอดเวลา มีวิธีการเตรียมสารละลายดังนี้ (พรเพ็ญ เปรมโยธิน และคณะ, 2538 ; วัชราภรณ์ ปัชชามาตย์, 2539)

สารละลาย A : Calcium free medium (pH 7.4) ประกอบด้วย

NaCl	2.805 g
KCl	0.057 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.08625 g
KH_2PO_4	0.17 g
$NaHCO_3$	1.26 g
D-gluconic acid	2.3665 g
Ultrapurified water to	500.0 ml

equilibrate with carbogen gas

(แยกชั่งและละลาย $NaHCO_3$ ต่างหาก แล้วนำมาผสมกับสารละลายที่เหลือ)

สารละลาย B : Calcium buffer solution (pH 7.4) ประกอบด้วย

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0357 g
Calcium free medium to	150.0 ml

สารละลาย C : Cleaning solution (pH 7.4) ประกอบด้วย

1.	Bovine Serum Albumin	0.96 g
	Calcium buffer solution to	30.0 ml
2.	Bovine Serum Albumin	1.2 g
	Calcium buffer solution to	100.0 ml

สารละลาย D : Collagenase solution (pH 7.4) ประกอบด้วย

1.	Collagenase	0.01 g
	Calcium free medium to	10.0 ml
2.	Collagenase	0.04 g
	Calcium free medium to	20.0 ml

สารละลาย E : Eagle's basal medium (pH 7.4) ประกอบด้วย

Bovine Serum Albumin	1.2 g
MEM	10.0 ml
L-glutamine	1.0 ml
$NaHCO_3$ (2.8% w/v) in ultrapurified water to	10.0 ml
Ultrapurified water to	100.0 ml

3. การเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาว (preparation of isolated rat hepatocytes) มีขั้นตอนดังนี้

3.1 ดมสลบหนูขาวด้วย diethylether ผ่าตัดเปิดหน้าท้อง เพื่อทำการสอดท่อแคนูลาเข้า portal vein (รูปที่ 14)

3.2 two steps perfusion โดยการปล่อยให้ calcium free medium ไหลผ่านตับแบบไหลทิ้ง (nonrecirculating perfusion) ทำการตัดตับออกจากตัวหนูขาวหลังจากนั้นใช้ collagenase solution (2) ไหลผ่านตับแบบไหลเวียนซ้ำ (recirculating perfusion) เป็นเวลา 10 นาที

3.3 disruption of collagenase-perfused liver แกว่งให้เซลล์ตับหลุดเป็นอิสระใน collagenase solution (2) นำไปแบ่งใส่ใน erlenmeyer flask (250 ml x 2) ล้างด้วย collagenase solution (1) ให้แก๊ส carbogen ตลอดเวลาและเขย่าใน metabolic shaker bath (150 ครั้ง/นาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านผ้ากรองไนลอน 2 ครั้ง และล้างเอาเซลล์ออกให้มากที่สุดด้วย cleaning solution (1)

3.4 purification of parenchymal cells นำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยไปปั่นแยก parenchymal cells ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที 2 ครั้ง โดยล้างเซลล์แขวนลอยด้วย cleaning solution (2) ในขั้นสุดท้ายเซลล์ตับอิสระจะแขวนลอยอยู่ใน eagle's basal medium

$$\text{ปริมาตร eagle's basal medium ที่เติมในเซลล์ตับอิสระ (ml)} = \frac{\text{จำนวนกรัมของเซลล์ตับอิสระ} \times \text{ปริมาตร eagle's basal medium 1 ml}}{\text{จำนวนเซลล์ตับอิสระ 0.04 g}}$$

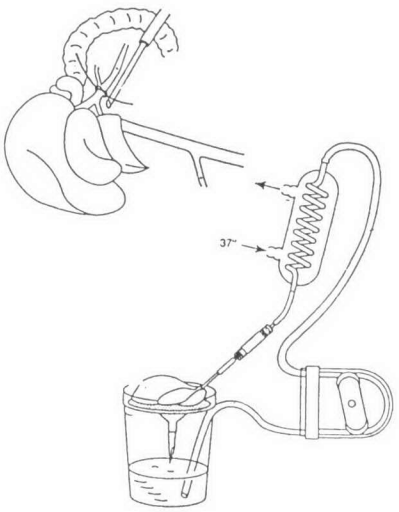
3.5 trypan blue exclusion test ผสมเซลล์ตับอิสระแขวนลอย 50 µl กับ 0.4%trypan blue 50 µl ตรวจนับจำนวนเซลล์ใน counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

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

เซลล์ตับอิสระที่มีค่า trypan blue exclusion เกิน 86% สามารถนำมาใช้ในการทดลองต่อไปได้

3.6 incubation of isolated hepatocyte suspension ในทุกการทดลองใช้เซลล์ตับอิสระแขวนลอยปริมาตร 3 ml ต่อตัวอย่าง ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 25 ml โดยให้แก๊ส carbogen ตลอดเวลา นำไปอุ่นใน metabolic shaker bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.7 การหาน้ำหนักเปียกของเซลล์ตับ (wet weight) ผลของค่าวัดส่วนใหญ่จะคำนวนต่อหน่วย wet weight โดยนำเซลล์แขวนลอย 1 ml ใส่หลอดทดลองที่ทราบน้ำหนัก (2 ตัวอย่าง) ไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวลอยตัว (supernatant) ทิ้งแล้วคว่ำหลอดทดลองเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปชั่งหาน้ำหนักเฉลี่ย (mg/ml)



รูปที่ 14 แสดงตำแหน่งการสอดท่อ cannula เข้า portal vein (Seglen, 1993)

4. การตรวจวัด cell membrane integrity

เป็นการตรวจวัด activity ของเอ็นไซม์ GOT & GPT ใน supernatant โดยการปิเปตเซลล์ตับอิสระแขวนลอย 1.0 ml/ตัวอย่าง ใส่หลอดทดลอง ปั่นแยกที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนของเหลวใสเหนือตะกอน (supernatant) ใส่ใน microtube นำไปตรวจวัด activity ของเอ็นไซม์ GOT & GPT ตามวิธีการของ Reitman and Franbel (1975) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป (ดังกล่าวมาแล้วในการศึกษา in vivo)

5. การตรวจวัด reduced glutathione (GSH)

ใช้วิธีการของ Ellman (1959) ซึ่งปรับปรุงโดย Jollow, et al (1974) โดยนำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยตัวอย่างละ 0.5 ml ผสมกับ 4% sulfosalicylic acid 0.5 ml ปั่นแยกที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำ supernatant 0.5 ml เติมสารละลาย 0.1 mM dithiobenzoic acid (ใน 0.1 M phosphate buffer pH 8) ปริมาตร 4.5 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm (ความเข้มข้นของ GSH คำนวนจากค่า extinction coefficient 13,600 M^{-1} cm^{-1})

6. การตรวจวัดการเกิด lipid peroxidation (malondialdehyde : MDA)

ใช้ thiobarbituric acid assay ตามวิธีการของ Buege and Aust (1978) โดยนำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยตัวอย่างละ 1.5 ml ผสมกับสารละลาย stock TCA-TBA-HCl (15% trichloroacetic acid + 0.375% thiobarbituric acid ใน 0.25 N hydrochloric acid) ปริมาตร 3 ml นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 nm (ความเข้มข้นของ malondialdehyde ที่เกิดขึ้น คำนวนจากค่า extinction coeffience 1.56×10^5 M^{-1} cm^{-1})

7. การทดสอบผลต่อ aminopyrine N-demethylation

ใช้ aminopyrine N-demethylation ตามวิธีการของ Gibson and Skett (1994) และ Marzel (1972) ได้นำมาปรับปรุงเปลี่ยนแปลงเพื่อความเหมาะสม ดังนี้

: การทำ standard curve ของ aminopyrine N-demethylation

1. เตรียม stock solution ของ 0.1 mM formaldehyde (0.75 ml ของ 40% formaldehyde solution ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml นำสารละลายที่เจือจางนี้มา 0.25 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 ml)

2. นำ 0.1 mM formaldehyde มา 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรให้เป็น 2 ml ด้วยน้ำกลั่น

3. เติม 2 ml Nash reagent (30% ammonium acetate + 0.4% acetyl acetone) แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm คำนวณค่าของ aminopyrine N-demethylation standard curve

: การทดสอบผลต่อ aminopyrine N-demethylation

1 นำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยตัวอย่างละ 3 ml ผสมกับ 0.1 ml ของ 5 mM aminopyrine ใน 0.1 M Tris buffer (pH 7.4) และ 5 mM semicarbazide

2. อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน metabolic shaker bath (150 ครั้ง/นาที) เป็นเวลา 30 นาที

3. ใส่ 1 ml ของ 10% TCA (trichloroacetic acid) ที่ละลายใน 0.25 N HCl (hydrochloric acid) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

4. ปิเปตส่วนของ supernatant มา 2 ml ผสมกับ 2 ml ของ Nash reagent (30% ammonium acetate + 0.4% acetyl acetone) แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm คำนวณค่าของ aminopyrine N-demethylase activity กับ standard curve

8. การทดสอบผลต่อ aniline hydroxylation

ใช้ aniline hydroxylation ตามวิธีการของ Gibson and Skett (1994) ได้นำมาปรับปรุงเปลี่ยนแปลงเพื่อความเหมาะสม ดังนี้

: การทำ standard curve ของ aniline hydroxylation

1. เตรียม stock solution ของ 10 μM 4-aminophenol (ชั่ง 36.5 mg ของ 4-aminophenol ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 ml นำสารละลายนี้มา 0.1 ml และเติม 15 g TCA ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 ml)

2. นำ 10 μM 4-aminophenol มา 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 และ 3.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรให้เป็น 3 ml ด้วย 6% TCA

3. เติม 1 ml ของ 1% phenol (1 g phenol + 2 g NaOH + 100 ml H_2O) และ 1 ml ของ 1 M Na_2CO_3 (sodium carbonate) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm คำนวณค่าของ aniline hydroxylation standard curve

: การทดสอบผลต่อ aniline hydroxylation

1. นำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยตัวอย่างละ 3 ml ผสมกับ 0.1 ml ของ 5 mM (final concentration) aniline ใน 0.1 M Tris buffer (pH 7.4)

2. อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน metabolic shaker bath (150 ครั้ง/นาที) เป็นเวลา 15 นาที

3. ใส่ 1 ml ของ 20% TCA (ice-cold trichloroacetic acid) ที่ละลายในน้ำกลั่น และ 0.1 ml ของ 5 mM $HgCl_2$ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ใน ice bath เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

4. ปิเปตส่วน supernatant มา 3 ml เติม 1 ml ของ 1% phenol และ 1 ml ของ 1 M Na_2CO_3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm คำนวณค่าของ aniline hydroxylase activity กับ standard curve

5. วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษา in vivo

1. ศึกษาขนาดและระยะเวลาการเกิดพิษต่อตับของ (+)-usnic acid ในหนูขาว โดยให้หนูขาวได้รับ (+)-usnic acid ทางการฉีดเข้าช่องท้อง (ip) เป็นเวลา 5 วัน และทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : Control - เป็นหนูขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ intervention หรือ treatment ใด

กลุ่มที่ 2 : DMSO - เป็นหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ (+)-usnic acid ทาง ip เป็นเวลา 5 วัน

กลุ่มที่ 3 : (+)-usnic acid 50 mg/kg - เป็นหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 50 mg/kg ทาง ip เป็นเวลา 5 วัน

กลุ่มที่ 4 : (+)-usnic acid 200 mg/kg - เป็นหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 200 mg/kg ทาง ip เป็นเวลา 5 วัน

<u>วิธีการทดลอง</u>

ดมสลบหนูขาวทั้งหมดภายหลังได้รับ intervention ในปริมาณและกำหนดเวลาที่ต้องการศึกษา ทำการ draw เลือดจาก inferior vena cava เพื่อนำมาตรวจวัด activity ของเอ็นไซม์ SGOT & SGPT และตัดตับส่งตรวจทาง histopathology (TEM)

(หมายเหตุ : ใช้สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มจำนวน 4 ตัว ; n = 4)

การศึกษา in vitro

1. ศึกษาความเป็นพิษของ (+)-usnic acid ต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : Control - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ไม่ได้รับ intervention หรือ treatment ใดๆ

กลุ่มที่ 2 : DMSO - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl

กลุ่มที่ 3 : (+)-usnic acid 10^{-5} M - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-5} M ใน cell suspension 3 ml

กลุ่มที่ 4 : (+)-usnic acid 10^{-4} M - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-4} M ใน cell suspension 3 ml

กลุ่มที่ 5 : (+)-usnic acid 10^{-3} M - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-3} M ใน cell suspension 3 ml

<u>วิธีการทดลอง</u>

นำเซลล์ตับอิสระของหนูขาวที่แยกได้ ไปอุ่นร่วมกับ (+)-usnic acid ที่ความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน metabolic shaker bath เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาตรวจวัด activity ของเอ็นไซม์ GOT & GPT, ปริมาณของ GSH และ MDA

(หมายเหตุ : ใช้สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มจำนวน 4 ตัว ; n = 4 โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง)

2. ศึกษาการเกิดพิษของ (+)-usnic acid เมื่อให้ร่วมกับ CCl_4 ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : Control - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ไม่ได้รับ intervention หรือ treatment ใดๆ

กลุ่มที่ 2 : DMSO - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl

กลุ่มที่ 3 : CCl_4 - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ CCl_4 จำนวน 10 µl

กลุ่มที่ 4 : (+)-usnic acid 10^{-5} M + CCl_4 - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-5} M ใน cell suspension 3 ml ร่วมกับ CCl_4 จำนวน 10 µl

กลุ่มที่ 5 : (+)-usnic acid 10^{-4} M + CCl_4 - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-4} M ใน cell suspension 3 ml ร่วมกับ CCl_4 จำนวน 10 µl

กลุ่มที่ 6 : (+)-usnic acid 10^{-3} M + CCl_4 - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-3} M ใน cell suspension 3 ml ร่วมกับ CCl_4 จำนวน 10 µl

<u>วิธีการทดลอง</u>

นำเซลล์ตับอิสระของหนูขาวที่แยกได้ ไปอุ่นร่วมกับ CCl_4 และ (+)-usnic acid ที่ความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน metabolic shaker bath เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาตรวจวัด activity ของเอ็นไซม์ GOT & GPT, ปริมาณของ GSH และ MDA

(หมายเหตุ : ใช้สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มจำนวน 4 ตัว ; n = 4 โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง)

3. ศึกษาการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 (CYP 2B, 2C) ของ (+)-usnic acid ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : Control - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ไม่ได้รับ intervention หรือ treatment ใดๆ

กลุ่มที่ 2 : DMSO - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl

กลุ่มที่ 3 : (+)-usnic acid 10^{-4} M - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-4} M ใน cell suspension 3 ml

กลุ่มที่ 4 : (+)-usnic acid 10^{-3} M - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-3} M ใน cell suspension 3 ml

วิธีการทดลอง

นำเซลล์ตับอิสระของหนูขาวที่แยกได้ ไปอุ่นร่วมกับ (+)-usnic acid ที่ความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-3} M และร่วมกับ 5 mM aminopyrine ใน 0.1 M Tris buffer (pH 7.4) และ 5 mM semicarbazide ใน metabolic shaker bath เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปทดสอบผลต่อ aminopyrine N-demethylation

(หมายเหตุ : ใช้สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มจำนวน 4 ตัว ; n = 4 โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง)

4. ศึกษาการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 (CYP 2E1) ของ (+)-usnic acid ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) โดยให้หนูขาวได้รับ 0.1% INH (isoniazid) ผสมในน้ำดื่ม เป็นเวลา 10 วัน นำมาแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : Control - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ไม่ได้รับ intervention หรือ treatment ใดๆ

กลุ่มที่ 2 : DMSO - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl

กลุ่มที่ 3 : (+)-usnic acid 10^{-3} M - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-3} M ใน cell suspension 3 ml

กลุ่มที่ 4 : (+)-usnic acid 10^{-2} M - เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ (+)-usnic acid จำนวน 10 µl ความเข้มข้น 10^{-2} M ใน cell suspension 3 ml

วิธีการทดลอง

นำเซลล์ตับอิสระของหนูขาวที่แยกได้ ไปอุ่นร่วมกับ (+)-usnic acid ที่ความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-2} M และร่วมกับ 5 mM (final concentration) aniline ใน 0.1 M Tris buffer (pH 7.4) ใน metabolic shaker bath เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปทดสอบผล aniline hydroxylation

(หมายเหตุ : ใช้สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มจำนวน 4 ตัว ; n = 4 โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง)

6. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การแสดงผลการทดลองแสดงเป็น 3 ลักษณะ คือ

1. รูปภาพ
2. แผนภูมิแท่ง
3. ตาราง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. Mean ± SEM : ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ใช้ในการนำเสนอข้อมูลของพารามิเตอร์ทางชีวเคมี
2. Unpaired t-test สำหรับข้อมูลแต่ละกลุ่มกันที่เวลาเดียวกัน