สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้(Wistar albino rats) น้ำหนักระหว่าง 160-200 กรัม อายุ 6-8 สัปดาห์ จาก สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม ก่อนทำการศึกษา เลี้ยงสัตว์ทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย โดยให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำสะอาดไม่จำกัดปริมาณ ควบคุมช่วงเวลาสลับความมืดและสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส

2 แหล่งวัตถุดิบ

กะเม็งสดจากชมรมรักษ์สมุนไพร จังหวัดลำปาง

3 วิธีเตรียมสารสกัดกะเม็ง

3.1 นำกะเม็งทั้งต้นมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด

3.2 นำสมุนไพรที่ได้มาต้มกับน้ำด้วยอัตราส่วนของสมุนไพร(10 กรัม) : น้ำ(100 มิลลิลิตร) จนเดือดเป็นเวลา 10 นาทีและตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.3 รินสารสกัดน้ำออกและนำกากที่เหลือมาต้มกับน้ำอีกครั้งหนึ่งด้วยอัตราส่วนเท่ากันด้วยวิธีการเดียวกัน

3.4 รินสารสกัดน้ำออกรวมกับข้อ 3.3 และทิ้งกากที่เหลือ

3.5 นำสารสกัดที่ได้ไป centrifuge ด้วยความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

3.6 นำส่วน supernatant ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยเครื่อง suction apparatus แล้วนำไประเหยแห้งบน water bath สารสกัดแห้งที่ได้จึงนำมาบดเป็นผงไว้ศึกษาต่อไป

4 วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาผลการปกป้องตับของสารสกัดกะเม็งต่อพิษของเอทานอลในหนูขาว

4.1 ระยะเฉียบพลัน(Acute phase) ศึกษาฤทธิ์การป้องกันโดยให้สารสกัดก่อนให้เอทานอล

สัตว์ทดลอง คือ หนูขาวเพศผู้(Wistar albino rats) 48 ตัว แบ่งโดยการสุ่มเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาวปกติ ให้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรทางปาก

กลุ่มที่ 2 กลุ่มเอทานอล ให้เอทานอล 5 กรัม/กิโลกรัมทางปาก

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 3 ให้สารสกัดกะเม็งขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมทางปาก หลังจากนั้น 4 ชั่วโมงจึงให้เอทานอล 5 กรัม/กิโลกรัมทางปาก

กลุ่มที่ 4 ให้สารสกัดกะเม็งขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมทางปาก หลังจากนั้น 4 ชั่วโมงจึงให้เอทานอล 5 กรัม/กิโลกรัมทางปาก

กลุ่มที่ 5 ให้สารสกัดกะเม็งขนาด 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัมทางปาก หลังจากนั้น 4 ชั่วโมงจึงให้เอทานอล 5 กรัม/กิโลกรัมทางปาก

กลุ่มที่ 6 ให้ซิไลมารีนขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมทางปาก หลังจากนั้น 4 ชั่วโมงจึงให้เอทานอล 5 กรัม/กิโลกรัมทางปาก

หลังจากให้เอทานอลไป 2 ชั่วโมงหนูทุกตัวจะถูกทำให้เสียชีวิตโดยวิธีดมสลบด้วย ether และเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อไปตรวจค่าทางเคมีคลินิก คือ การวิเคราะห์หาระดับ AST, ALT, serum triglyceride(STG), TNF-α และ IL-1β จากนั้นเนื้อตับส่วนหนึ่งจะนำไปตรวจระดับของ hepatic triglyceride(HTG), GSH และ MDA เนื้อตับอีกส่วนหนึ่งนำไปตรวจจุลพยาธิวิทยา (Histopathological examination) และการตรวจพิเศษดู fat vacuole (Oil Red O)เพื่อตรวจสอบพยาธิสภาพของตับและผลในการปกป้องตับจากสารสกัดกะเม็ง

4.2 ระยะกึ่งเฉียบพลัน(Subacute phase) ศึกษาฤทธิ์การรักษาโดยทำให้เกิดพิษจากเอทานอลก่อนให้สารสกัด

สัตว์ทดลอง คือ หนูขาวเพศผู้(Wistar albino rat) 48 ตัว แบ่งโดยการสุ่มเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาวปกติ ให้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรทางปาก เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 2 กลุ่มเอทานอล ให้เอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัมทางปาก เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 3 ให้เอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัมทางปาก เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นให้สารสกัดกะเม็ง 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 4 ให้เอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัมทางปาก เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นให้ซิไลมารีนขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมทางปาก เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 5 ให้เอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัมทางปาก เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นให้สารสกัดกะเม็ง 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับซิไลมารีน 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 6 ให้เอทานอล 4 กรัม/กิโลกรัมทางปาก เป็น เวลา 21 วัน จากนั้นดูแลให้ได้รับอาหารและน้ำตามปกติเป็นเวลา 7 วัน

หลังจากให้เอทานอลไป 2 ชั่วโมงหนูทุกตัวจะถูกทำให้เสียชีวิตโดยวิธีดมสลบและเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อไปตรวจค่าทางเคมีคลินิก คือ การวิเคราะห์หาระดับ AST, ALT, serum triglyceride(STG), TNF-α และ IL-1β เนื้อตับส่วนหนึ่งจะนำไปตรวจระดับของ hepatic

triglyceride(HTG), GSH และ MDA นอกจากนั้นเนื้อตับอีกส่วนหนึ่งนำไปตรวจจุลพยาธิวิทยา (Histopathological examination) และการตรวจพิเศษดู fat vacuole (Oil Red O) เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาสภาพของตับและผลในการปกป้องตับจากสารสกัดกะเม็ง

5 สารเคมีและเครื่องมือ

สารเคมี: Deionized water, Sodium phosphate monobasic ($NaH_2PO_4H_2P$), Conc.NaOH, Paraformaldehyde, Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), 5,5 Dithiobenzoic acid,Sulfosalicylic acid, Hydrochloric acid(HCL) solution, Trichloroacetic acid (TCA), Thiobarbituric acid(TAB), NaCl, Glacial acetic acid, Sodim metaperiodate, 2,4 Pentonedione, H_2SO_4, Heptane, Trioleine standard, Silymarin, Ethanol, Diethylether

เครื่องมือ: เครื่องบด, กระดาษกรอง Whatman No.1, Hot plate, Suction apparatus, Beaker, Dropper, Water bath, Centrifuge, Autopipets, Spectrophotometer, Homogenizing vessel, Refrigerated centrifuge, Sonicator, Surgical equipment, Timer, Votex mixer , pH meter, Microplate reader, Laminar air flow hood, Glass homogenizer, Foild, Cuvettes, Eppendorf tube สำหรับใส่เลือด, สำลี, ตาชั่ง, ขวดสำหรับใส่ชิ้นเนื้อ, หลอดทดลอง

6 การเก็บตัวอย่าง

6.1 ทำการสลบหนู โดยใส่ในขวดโหลที่มี diethylether หลังจากหนูสลบนำมาผ่าตัดหน้าท้องและเจาะเลือดจาก inferior vena cava เก็บเลือดใส่ eppendorf tube แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที

6.2 จากนั้นตัด inferior vena cava ให้เปิดกว้างและไล่เลือดออกจากตับด้วย 0.9% NaCl จนตับมีสีซีด เลาะตับออกจากตัวหนูและล้างเลือดที่เกาะอยู่ด้วย 0.9% NaCl

6.3 ชั่งน้ำหนักตับทั้งหมดและตัดตับส่วนหนึ่งเพื่อไปตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

6.4 จากนั้นนำตับส่วนที่เหลือไป homogenize ร่วมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และบดด้วยเครื่อง motor homogenizer จนเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อวัดระดับ hepatic triglyceride(HTG), GSH และ MDA

6.5 นำเลือดที่เก็บใน eppendorf tube ไปปั่นแยกเก็บ serum ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 rpm 10 นาที เพื่อวัดระดับ AST, ALT, serum triglyceride(STG), TNF-α และ IL-1 β

7 การตรวจค่าทางเคมีคลินิก

การวิเคราะห์ระดับ serum AST และ ALT

การศึกษาครั้งนี้ใช้ reagent สำเร็จรูปซึ่งประกอบด้วย substrate และ reagent โดยอาศัย

หลักการทำงานแบบจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ยึดหลักตามวิธีการของ IFCC(International Federation of Clinical Chemistry) โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 nm

1 ใส่ reagent สำเร็จรูปสำหรับวัด AST, ALT ปริมาณ 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองตามจำนวนตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

2 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ในอ่างน้ำร้อน(Water bath)

3 เติมซีรัมที่ต้องการวัดลงไป 100 ไมโครลิตรในหลอดทดลองต่อ 1 ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

4 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ณ เวลาที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

5 นำค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณหาระดับเอนไซม์

ข้อควรระวัง การเก็บตัวอย่างเลือดควรระวังการแตกของเม็ดเลือดแดงเนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์ทั้ง AST และ ALT อยู่อาจทำให้ค่าที่ได้สูงขึ้นกว่าค่าจริงในตับได้

การวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอไรด์ในซีรัม(STG)

1 นำ reagent สำเร็จรูปสำหรับการวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอไรด์ มา incubate ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้โดยเติมสารต่างๆลงไปตามลำดับดังนี้

	Blank	**Sample/Standard**
Reagent	1.0 ml	1.0 ml
Redistilled water	10 µl	-
Sample/Standard	-	10 µl

2 ผสมด้วยเครื่องผสม(Mixer) และ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ในอ่างน้ำร้อน(water bath) เป็นเวลา 5 นาที

3 จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 nm

การวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอไรด์ในตับ(HTG)(Mendez and Franklin, 1975)

สำหรับการวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอไรด์ในตับใช้วิธีวัดเทียบสี ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ระดับกลีเซอรอลซึ่งเกิดจากไฮโดรไลส์ไตรกลีเซอร์ไรด์ด้วยสารละลายด่างและเรียกขบวนการนี้ว่า

"saponification" จากนั้นกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดส์ด้วยเปอร์ไอโอเดทได้เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งจะทำให้เกิดสีได้แก่ อะเซทิลอะซิโตนแล้วเกิดสารสีเหลือง

1 ทำการวิเคราะห์ด้วยการเติมสารต่างๆลงไปตามลำดับดังนี้

สารและตัวอย่าง	Liver homogenat(ml)	Blank(ml)	Standard(µl)
Liver homogenate	0.5	-	-
Standard	-	-	10, 20, 30 และ 40
H_2O	-	0.5	190, 180,170 และ 160
Heptane	2.0	2.0	-
Isopropanol	3.5	3.5	-
H_2SO_4	1.0	1.0	-

2 ผสมด้วยเครื่องผสม(Mixer) แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น 30 วินาที ใช้ปิเปตดูดส่วนบน 0.2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม isopropanol 2 มิลลิลิตรและ saponification reagent 0.6 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม(Mixer) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

3 จากนั้นใส่ sodium metaperiodate และ acetyl acetone อย่างละ 1.5 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C ในอ่างน้ำร้อน(Water bath) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 nm

ข้อควรระวัง ควรวัดค่าดูดกลืนแสงภายใน 45 นาที

การวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde(MDA)(Buege and Aust, 1978)

1 ปิเปตเนื้อตับที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ให้หลอดทดลองละ 1 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง ตามจำนวนหลอดทดลองที่ต้องการโดยมีหลอดทดลองที่ใช้เป็น blank 1 หลอด

2 เติมสารละลาย TCA-TBA-HCL 3 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน

3 Incubate ที่อุณหภูมิ 100 °C ในอ่างน้ำร้อน(Water bath) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น centrifuge ที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4 นำส่วนใสด้านบนไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่น 535 nm

ข้อควรระวัง blank ให้ผ่านขั้นตอนเหมือนกับตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ระดับ glutathione(GSH)[Ellman(1959) ที่ปรับปรุงโดย Jollow, *et al* (1974)]

1 ปิเปตเนื้อตับที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ให้หลอดทดลองละ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง ตามจำนวนหลอดทดลองที่ต้องการโดยมีหลอดทดลองที่ใช้เป็น blank 1 หลอด

2 เติมสาร 4 % sulfosalicylic acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม(mixer) และนำไป centrifuge ที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

3 นำส่วนใสด้านบนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ 0.1 mM dithiobenzoic acid in 0.1 M PBS pH 8 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม(Mixer)

4 จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm

ข้อควรระวัง blank ให้ใส่ distilled water + 0.1 mM dithiobenzoic acid เลยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการใส่ 4 % sulfosalicylic acid

การวิเคราะห์ TNF-α ELISA

หลักการตรวจวัดระดับของ TNF-α ใช้วิธีการวัดด้วย 96-well strip plate ที่ coated ไว้ด้วย Anti-rat TNF-α จากนั้นนำไป incubate ด้วย serum ที่มี TNF-α แล้ว incubate ต่อด้วย antibody ที่ถูกจับไว้ด้วยเอนไซม์ ส่วน TNF-α จะถูกจับด้วย antibody เมื่อใส่ substrate ทำให้เกิดการทำปฏิกิริยากันระหว่างเอนไซม์และ substrate เกิดสีขึ้น นำไปวัดหาปริมาณ TNF-α โดยวัดค่า absorbance ด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากนั้นนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ TNF-α โดยคำนวณจาก standard curve ที่ทราบความเข้มข้น

1 เตรียม standard โดยเติม Standard Diluent Buffer ใน Reconstitute standard 5,000 pg/mL จากนั้นปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตรใส่ใน eppendorf tube ที่มี Standard Diluent Buffer 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว label ที่ 1,000 pg/Rt TNF-α

2 หลังจากผสมแล้วปิเปตมา tube ละ 0.25 มิลลิลิตรใส่ใน appendrop tube 6 tube ที่ในแต่ละ tube มี Standard Diluent Buffer 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว label ที่ 500, 250, 125, 62.5, 31.2 และ 15.6 pg/Rt TNF-α ตามลำดับ

3 ใส่ incubate buffer หลุมละ 50 µl ทุกหลุม

4 ใส่ standard ที่ความเข้มข้น 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 หลุมละ 100 µl ตามลำดับ

5 หลุมที่เหลือใส่ Standard Diluent Buffer หลุมละ 50 µl และ ซีรั่ม 50 µl จากนั้นใส่ 50 µl ของ biotinylated anti-TNF-α ปิด plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง

6 ใส่ Streptavidin-HRP reagent 100 µl และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง

7 ใส่ Stabilized Chromogen 100 µl ลงแต่ละหลุมจะเกิดสีน้ำเงิน จากนั้นทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา

ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

8 หยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใส่ stop solution 100 µl จากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm

การวิเคราะห์ IL-1β ELISA

หลักการตรวจวัดระดับของ IL-1β ใช้วิธีการวัดด้วย 96-well strip plate ที่ coated ไว้ด้วย Anti-rat IL-1β จากนั้นนำไป incubate ด้วย serum ที่มี IL-1β แล้ว incubate ต่อด้วย antibody ที่ถูกจับไว้ด้วยเอนไซม์ ส่วน IL-1β จะถูกจับด้วย antibody เมื่อใส่ substrate ทำให้เกิดการทำปฏิกิริยากันระหว่างเอนไซม์และ substrate เกิดสีขึ้น นำไปวัดหาปริมาณ IL-1β โดยวัดค่า absorbance ด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากนั้นนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ IL-1β โดยคำนวณจาก standard curve ที่ทราบความเข้มข้น

1 เตรียม standard โดยเติม Standard Diluent Buffer ใน Reconstitute standard 10,000 pg/mL จากนั้นปิเปตมา 0.12 มิลลิลิตรใส่ใน appendrop tube ที่มี Standard Diluent Buffer 0.48 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว label ที่ 2,000 pg/mL raIL-1β

2 หลังจากผสมแล้วปิเปตมา tube ละ 0.3 มิลลิลิตรใส่ใน appendrop tube 6 tube ที่ในแต่ละ tube มี Standard Diluent Buffer 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว label ที่ 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 pg/mL raIL-1β ตามลำดับ

3 หลุมที่เหลือใส่ Standard Diluent Buffer หลุมละ 50 µl และ ซีรั่ม 50 (l ปิด plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง

4 จากนั้นใส่ biotinylated anti- IL-1β 100 µl และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง

5 จากนั้นใส่ Streptavidin-HRP reagent 100 µl และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง

6 ใส่ Stabilized Chromogen 100 µlลงแต่ละหลุมจะเกิดสีน้ำเงินจากนั้นทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

7 หยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใส่ stop solution 100 µl จากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm

8 การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา(Histopathological lesion)

การศึกษาครั้งนี้ใช้ตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อนำไปประกอบกับผลทางชีวเคมีและยังเป็นพารามิเตอร์ที่สามารถบ่งชี้ถึงพยาธิสภาพของตับได้เป็นอย่างดี

การเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยาจนเป็นบล็อกพาราฟินมีขั้นตอนดังนี้(Humason, 1979)

1 การเก็บตัวอย่าง(Specimen)

เมื่อสัตว์ตายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ จึงต้องทำการเก็บตัวอย่างด้วยความรวดเร็วเพื่อให้เซลล์คงสภาพใกล้เคียงกับเมื่อยังมีชีวิตมากที่สุด ดังนั้นเมื่อผ่าซากหนูขาวพันธุ์วิสตาร์จึงตัดชิ้นเนื้อตับแล้วรีบล้างในนอร์มอลซาไลน์(NaCl 0.9%) เพื่อล้างเลือดที่ติดมากับเนื้อเยื่อออกบ้าง การใช้นอร์มอลซาไลน์เนื่องจากมีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายภายในเซลล์จะได้ไม่เกิดกรณีเซลล์เหี่ยวหรือบวมพองจากการที่น้ำออกจากเซลล์หรือน้ำเข้าเซลล์ นอกจากนี้การล้างเลือดออกจากเนื้อเยื่อจะป้องกันการที่เลือดไปเจือจางคุณสมบัติของน้ำยาฟิกเซทิฟและเลือดที่มีมากเกินไปในเนื้อเยื่ออาจไปขัดขวางการแทรกซึมของน้ำยาฟิกเซทิฟทำให้การดองไม่สมบรูณ์

2 การดองเนื้อเยื่อ(Fixation)

ฟิกเซชั่น คือ ขบวนการที่พยายามรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงกับเมื่อมีชีวิตอยู่มากที่สุด เพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อ หยุดเอนไซม์ไม่ให้ย่อยสลายตัวเอง ทำให้โปรโตรปลาสซึมของเนื้อเยื่ออยู่ในสภาพแข็งตัวที่สำคัญคือช่วยให้การย้อมสีติดสีดีและเปลี่ยนแปลงการหักเหแสง เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นโครงสร้างต่างๆดีขึ้น โดยน้ำยาที่ใช้ในการฟิกเซชั่น คือ น้ำยาฟิกเซทิฟ ซึ่งมีหลายสูตรให้เลือกใช้ตามวัตถุประสงค์ โดยการศึกษาครั้งนี้หลังจากทำการตัดชิ้นเนื้อตับจึงทำการแช่ในสารละลาย 10 % นิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินซึ่งเหมาะสำหรับการเก็บรักษาชิ้นเนื้อทั่วไปทั้งที่ต้องการย้อมสีธรรมดาหรือสีพิเศษแทบทุกกรณี(เวคิน,2524)

3 การล้าง(Washing)

หลังจากดองด้วยน้ำยาฟิกเซทิฟ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดต้องนำเนื้อเยื่อมาล้างน้ำยาออกเรียกขั้นตอนนี้ว่า การล้าง(Washing) ซึ่งมีวิธีแตกต่างกัน การศึกษาครั้งนี้ดองด้วยสารละลาย 10 % นิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน ให้ล้างด้วยน้ำประปา(Tap water) โดยเปิดให้น้ำไหลผ่าน

4 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ(Dehydration)

การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมพร้อมที่จะให้สารที่ใช้ฝังลงในเนื้อเยื่อ(embedding media) เข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งสารนี้ไม่สามารถละลายเข้ากับน้ำได้จึงต้องดึงน้ำออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อให้หมด สารเคมีที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ เรียกว่า ดีไฮแดรนต์ (dehydrant) โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้แอลกอฮอล์โดยการนำเนื้อเยื่อผ่านแอลกอฮอล์จากระดับต่ำไประดับสูง เริ่มจาก 70%, 95% และแอบโซลูทแอลกอฮอล์ เพื่อช่วยไม่ให้เนื้อเยื่อและเซลล์เสียหายจากการหดตัวและการเหี่ยวของเซลล์(Shrinkage)

5 เคลียริ่ง(Clearing)

การนำสารเคมีตัวใหม่มาแทนที่สารดีไฮแดรนต์ โดยที่สารเคมีตัวนี้จะเป็นตัวกลางในการนำสารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อเข้าสู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เนื่องจากสารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ เช่น พาราฟินหรือขี้ผึ้ง นั้นไม่สามารถละลายผสมกับแอลกอฮอล์ที่เป็นตัวดึงน้ำออกได้จึงจำเป็นต้องมีสารเคมีที่เข้ามา

แทนที่ดีไฮแดรนต์และเตรียมพร้อมที่จะให้มีการแทรกซึมของพาราฟีน เรียกว่า สารเคลียริ่งเอเจนท์ (Clearing agent) มีหลายตัวเช่น ไซลีน, โทลูอีน, เบนซีน, คลอโรฟอร์ม เป็นต้น นิยมใช้ไซลีน

6 การแทรกซึมของพาราฟีน(Infiltration)

เป็นการทำให้สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อหลังจากการเคลียริ่ง เพื่อเสริมสร้างให้เซลล์และองค์ประกอบต่างๆภายในเนื้อเยื่อมีความแข็งเท่าเทียมกันและสม่ำเสมอกันโดยตลอด สารที่ใช้การฝังเนื้อเยื่อ คือ พาราฟีนหรือขี้ผึ้ง เป็นต้น การแทรกซึมของพาราฟีนต้องทำในภาวะที่พาราฟีนหลอมเหลวโดยพาราฟีนควรหลอมเหลวก่อนใช้ประมาณ 24 ชั่วโมงหรือหลอมเหลวในตู้อบหลายๆวันจะทำให้แทรกซึมดีกว่าพาราฟีนที่หลอมเหลวใหม่ๆ

7 การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟีน(Embedding)

เมื่อเนื้อเยื่อผ่านการแทรกซึมของพาราฟีนเรียบร้อยแล้วจะมีพาราฟีนแทรกอยู่ทั่วไปในเซลล์และเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟีนที่หลอมเหลว จากนั้นทำให้พาราฟีนรอบๆเนื้อเยื่อมีอุณหภูมิลดลงจนแข็งตัวโดยมีเนื้อเยื่ออยู่ตรงกลาง เรียกว่า เอมเบดดิง(Embedding) ภาชนะที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อจะทำในแม่พิมพ์รูปสี่เหลี่ยม ปัจจุบันมีเครื่องหยอดพาราฟีน(Dispensor) ซึ่งจะอำนวยความสะดวกได้มาก

การตัดเซกชั่นชิ้นเนื้อตับ(Sectioning)

เนื้อตับที่ฝังในพาราฟีนแล้วจึงนำมาตัดเซกชั่นด้วยเครื่องไมโครโตม(Microtome) ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อสัตว์ให้เป็นแผ่นบางๆสม่ำเสมอกัน โดยมีปุ่มสำหรับความหนาหรือบางว่าต้องการกี่ไมครอนตั้งแต่ 1-20 ไมครอน การศึกษาครั้งนี้ใช้ความหนา 6 ไมครอน ไมโครโตมมีทั้งแบบหมุนด้วยมือ เรียกว่า โรตารีไมโครโตม(Rotary microtome) และแบบสไลดิ้งไมโครโตม(Sliding microtome) ซึ่งจะใช้ตัดเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ๆ หลังจากได้เซกชั่นที่ต้องการแล้วนำมาติดบนสไลด์(Affix) โดยเมื่อตัดเซกชั่นแล้วจึงนำมาลอยในหม้อต้มน้ำร้อน(Water bath) และติดบนสไลด์วางให้แห้งสนิทก่อนนำไปย้อมสีตามต้องการ นอกจากนี้ยังมีการตัดชิ้นเนื้ออีกวิธี คือ โฟรสเซนเซกชั่น (Frozen section)

<u>โฟรสเซนเซกชั่น(Frozen section)</u>

การตัดเซกชั่นโดยใช้ความเย็นจัด ใช้ในวัตถุประสงค์พิเศษ คือ เพื่อศึกษาเรื่องไขมัน(Fat) ซึ่งอาจสูญเสียสภาพนี้ในแอลกอฮอล์, พาราฟีนหลอมเหลวหรือความร้อน วิธีการนี้จะหยุดขบวนการของสิ่งมีชีวิตอย่างรวดเร็วโดยจะรักษาเอนไซม์ที่จะถูกทำลายในน้ำยาฟิกเซทิฟและสามารถป้องกันการสูญเสียสารเคมีในเซลล์ได้ เครื่องมือที่ใช้ในการตัดโฟรสเซนเซกชั่น เรียกว่า ไครโอสแตตหรือไครโอคัต(Cryostat or cryocut) ก่อนใช้จะต้องเปิดเครื่องเตรียมไว้ก่อนแล้วตั้งอุณหภูมิตามประเภทของเนื้อเยื่อที่จะตัดโดยตับจะใช้อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

หลังจากผ่าซากหนูทดลองแล้วจะเก็บตัวอย่างตับส่วนหนึ่งไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาศึกษาเรื่องไขมัน โดยนำชิ้นเนื้อตับวางบนฐานรองเนื้อเยื่อจากนั้นหยอดเอมเบดดิงมีเดีย (Embedding media) หุ้มเนื้อเยื่อ เอมเบดดิงมีเดียจะใช้สำหรับทำให้เนื้อตับแข็งซึ่งมีขายสำเร็จรูป ในอุณหภูมิปกติจะมีลักษณะ ใส เหนียว แต่เมื่ออยู่ในอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จะเป็นสีขาวขุ่น แข็งหุ้มเนื้อตับให้แข็งเวลาตัดเซกชั่นจะเป็นโครงสร้างค้ำจุนไม่ให้เนื้อตับบิดเบี้ยว นอกจากนี้ยังช่วยไม่ให้เนื้อตับแห้งด้วย การเก็บเนื้อเยื่อลักษณะนี้สามารถเก็บได้เป็นสัปดาห์ การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่อง LIECACM 1800 ตัดเซกชั่นหนา 6 ไมครอน แล้วนำไปติดบน coated slide แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องมีเดียเริ่มหลอมละลายทำให้เซกชั่นติดบนสไลด์แน่นไม่หลุดเวลาย้อมสี

การเมาต์(Mount) สไลด์ปิดโคเวอร์กลาสของโฟรสเซนเซกชั่นจะไม่ใช้เรซีนเมาต์ติ้งมีเดีย (Resin mounting media) ทั่วไปเนื่องจากไม่ได้ผ่านการเคลียริ่งด้วยไซลีน ถ้าเมาต์ด้วยเปอร์เมาต์จะผสมกับน้ำในเซกชั่นทำให้เซกชั่นขุ่นขาว ดังนั้นจึงใช้กลีเซอรีนเจลลีเมาต์สไลด์

<u>ประโยชน์ของโฟรสเซนเซกชั่น</u>

1 การศึกษาเกี่ยวกับไขมัน, เอนไซม์, เรดิโอไอโซโทป, การวินิจฉัยโรคในการผ่าตัด

2 การศึกษาเกี่ยวกับวิธีการทางฟลูออเรสเซนส์แอนติบอดีเทคนิค เช่น ศึกษาไวรัสพิษสุนัขบ้าจะนำสมองซึ่งมีไวรัสนี้สะสมมากมาศึกษา

3 การศึกษาเกี่ยวกับทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ โดยให้ยาจับกับสารเรืองแสงแล้วให้หนูทดลองหลายๆกลุ่มกิน เมื่อครบกำหนดให้นำสัตว์ทดลองมาเซกชั่นทำลักษณะฟิล์มเอ็กซเรย์ซึ่งเรืองแสงจึงสามารถบอกได้ว่ายาไปที่ส่วนใดของร่างกาย

<u>ข้อควรระวัง</u> การตัดเซกชั่นด้วยวิธีโฟรสเซนเซกชั่น(Frozen section) นั้นเก็บไว้ได้ไม่นาน สีจะซีดเนื่องจากผ่านขั้นตอนเร็ว

หลังจากเซกชั่นที่ติดบนสไลด์แห้งสนิทดีแล้วจะนำมาย้อมสีเพื่อให้เห็นความแตกต่างของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยสีที่ย้อมจะติดส่วนต่างๆแตกต่างกันไป วิธีย้อมสีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ

การทดสอบทางจุลพยาธิวิทยาด้วยวิธีย้อมสี Hematoxylin&Eosin(H&E) มี 9 ขั้นตอนดังนี้

สีฮีมาท็อกไซลีน(Hematoxylin) เป็นสีประเภทด่าง(Basic dye) ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถรวมกับส่วนของเซลล์ที่มีสภาพเป็นกรด เช่น นิวเคลียส, นิวคลีโอลัส จะติดสีน้ำเงินหรือสีม่วงเข้ม ส่วนสีอีโอซิน(Eosin) เป็นสีประเภทกรดจึงสามารถรวมกับส่วนของเซลล์ที่เป็นด่างได้ โดยเฉพาะไซโตปลาสซึมจะติดสีแดงหรือชมพูเข้ม ดังนั้นในสไลด์แผ่นเดียวกันสีจะตัดกัน คือ นิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินและไซโตปลาสซึมจะติดสีแดง เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงช่วยให้เห็นส่วนต่างๆของเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น มีขั้นตอนการย้อมดังนี้

1 การขจัดพาราฟิน(Deparaffinization)

การล้างพาราฟินออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยการจุ่มในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2 การเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ(Hydration)

การให้น้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยเริ่มจากแอลกอฮอล์ระดับสูงมาต่ำ คือ

- แอบโซลูทแอลกอฮอล์ ใช้เวลา 2 นาที เพื่อล้างไซลีนออกจากเนื้อเยื่อและมี 100% แอลกอฮอล์เข้าไปแทนที่ จากนั้นจุ่มใน 95% แอลกอฮอล์ 2 นาที และ 70% แอลกอฮอล์ อีก 2 นาที
- ล้างน้ำประปาโดยเปิดน้ำให้ไหลตลอดเวลา 5 นาที ขั้นตอนนี้จะมีน้ำเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อเต็มแทนที่แอลกอฮอล์

3 การย้อมสีครั้งแรก(Primary stain)

ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกไซลินเป็นการย้อมนิวเคลียสใช้เวลา 6 นาที สีฮีมาท็อกไซลิน แล้วล้างน้ำประปาโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่าน 5 นาที

4 การล้างสีส่วนเกินออก(Differentiation)

เป็นการแยกให้เห็นความแตกต่างระหว่างส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่จับสีและไม่จับกับสี ในที่นี้จะใช้กรดอ่อน คือ 1% แอซิดแอลกอฮฮล์ 1dip คือ การจุ่มในสารละลายตามจำนวนครั้งของการจุ่ม(1 dip คือ จุ่ม 1 ครั้ง) จากนั้นนำไปล้างน้ำแบบไหลผ่านประมาณ 5 นาที ในขั้นตอนนี้เนื้อเยื่อจะมีสภาพเป็นกรด

5 การปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง(Neutralization)

โดยจุ่มลงในสารละลายอิ่มตัวของลิเทียมคาร์บอเนต($LiCO_3$) 4 dip จากนั้นนำไปล้างน้ำแบบไหลผ่านอีก 5 นาที

6 การย้อมสีซ้ำ(Counterstain)

โดยใช้สีอีโอซินเพื่อย้อมไซโตปลาสซึมใช้เวลา 1 นาที สีอีโอซินเป็นสีประเภทแอซิดไดย์จึงจับกับส่วนประกอบที่เป็นด่างในไซโตปลาสซึม

7 การขจัดน้ำออก(Dehydration)

เป็นการเอาน้ำออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อโดยจุ่มสไลด์ใน 95% แอลกอฮอล์ 5 dip และตามด้วยแอบโซลูท แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

8 เคลียริ่ง(Clearing)

ขั้นตอนนี้จุ่มสไลด์ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อโปร่งใสยิ่งขึ้นและเป็นตัวกลางระหว่างแอลกอฮอล์กับเมาท์ติงมีเดียเนื่องจากแอลกอฮอล์ไม่ละลายเข้ากับเมาท์ติงมีเดีย

9 การปิดโคเวอร์กลาส(Mounting)

ใช้โคเวอร์กลาสปิดบนเซกชั่นที่ย้อมสีแล้ว โดยมีเมาท์ติงมีเดีย คือ เปอร์เมาด์(permount) เป็นตัวเชื่อมให้ติดสนิทกับสไลด์

การย้อม Oil Red O มีขั้นตอนดังนี้(Humason, 1979)

การย้อม Oil Red O เพื่อตรวจสอบ fat globule โดย lipid จะติดสีแดงสด(Bright red) ส่วน nuclei จะติดสีน้ำเงิน

1 นำเซกชั่นที่ได้จากการตัดด้วยวิธีโฟรสเซนเซกชั่นแช่ในสารละลาย 10 % ฟอร์มาลิน เป็นเวลา 10 นาที

2 ล้างน้ำแบบไหลผ่าน

3 จุ่มในสารละลาย Propylene glycol เป็นเวลา 5 นาที

4 ย้อมสีด้วย Oil Red O 10 นาที

5 จุ่มในสารละลาย 85% Propylene glycol 3 นาที

6 ล้างด้วยน้ำกลั่น

7 ย้อมสีซ้ำด้วยฮีมาท็อกไซลีน 1 นาที

8 ล้างน้ำแบบไหลผ่าน

9 การเมาต์สไลด์ด้วยกลีเซอรีนเจลลีเมาต์

การย้อมสีพีเอเอส (Periodic Acid Schiff - PAS) มีขั้นตอนดังนี้(Humason, 1979)

การย้อมสีพีเอเอส เพื่อดูการกระจายของไกลโคเจนซึ่งจะติดสีแดงม่วง

1 ล้างพาราฟินออกและเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อจนกระทั้งถึงการล้างน้ำประปาแบบไหลผ่านโดยที่ขั้นตอนต่างๆเหมือนการย้อมด้วย H&E

2 จากนั้นจุ่มลงในสารละลายเพอริโอดิกแอซิด นาน 5 นาที

3 ล้างน้ำแบบไหลผ่าน 5 นาที

4 จุ่มสไลท์ในชีฟส์รีเอเจนต์ นาน 30 นาที

5 เปลี่ยนมาจุ่มในสารละลายซัลไฟต์ 3 ครั้งๆละ 3 นาที

6 ล้างน้ำแบบไหลผ่าน นาน 10 นาที

7 ย้อมสีซ้ำด้วยฮีมาท็อกไซลีน 1 นาที

8 ขจัดน้ำออก, เคลียร์ในไซลีนและเมาต์ด้วยเปอร์เมาต์

9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

9.1 การแสดงผลการทดลองค่าเคมีคลินิกนำเสนอเป็นตาราง

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) ± ค่าความผิดพลาดมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey's test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

9.2 การแสดงผลทางจุลพยาธิวิทยานำเสนอเป็นภาพที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์