หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูพันธุ์วิสตาร์ เพศผู้ จากห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองแผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย น้ำหนักเริ่มต้น 75 ± 5 กรัม เลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 °ซ. โดยมีช่วงเวลาที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนซ์วันละ 14 ชั่วโมง และให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด รวมทั้งน้ำประปาตลอดเวลา ในการทดลองหนูถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังรายละเอียดตามขั้นตอนการทดลองในรูปที่ 1

กลุ่มที่ 1 ป้อนน้ำกลั่นในขนาด 2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม โดยใช้ stomach tube เพื่อจากอาหารและน้ำตามปรกติวันละครั้ง 30 วันติดต่อกัน หลังจากให้น้ำกลั่นครั้งสุดท้ายแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำ sham operation โดยใช้ anesthetic ether ระหว่างทำการผ่าตัดหลังจากทำ sham operation แล้ว 2 ชั่วโมง ป้อนน้ำกลั่นในขนาด 4 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

004672

กลุ่มที่ 2 ปฏิบัติเหมือนกลุ่มที่ 1 แต่ทำ partial hepatectomy แทน sham operation โดยการตัดตับส่วนที่เป็น median lobe และ left lateral lobe ออกทั้ง 2 lobe ซึ่งจะทำให้ปริมาณเนื้อตับลดลงไปจากเดิมประมาณ 3 ใน 4 หลังจากทำ partial hepatectomy แล้ว 2 ชั่วโมง ป้อนน้ำกลั่นในขนาด 4 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

กลุ่มที่ 3 ปฏิบัติการเหมือนกลุ่มที่ 2 แต่หลังจากทำ partial hepatectomy แล้ว 2 ชั่วโมง ป้อนเอทธานอล 10% (v/v) ในขนาด 4 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารละลายบอแรกซ์ซึ่งมีโบรอน 14 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม วันละครั้ง 30 วันติดต่อกัน หลังจากป้อนบอแรกซ์ครั้งสุดท้ายแล้ว 4 ชั่วโมงทำ partial hepatectomy หลังจากทำ partial hepatectomy แล้ว 2 ชั่วโมง ป้อนน้ำกลั่นในขนาด 4 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

กลุ่มที่ 5 ปฏิบัติเหมือนกลุ่มที่ 4 แต่หลังจากทำ partial hepatectomy แล้ว 2 ชั่วโมงป้อนเอทธานอล 10% (v/v) ในขนาด 4 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

i 17530313

การศึกตามผลและการศึกษาการเปลี่ยนแปลง ทำก่อนหรือหลังทำ partial hepatectomy ในช่วงเวลาต่างๆ กัน

2.2 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

บันทึกน้ำหนักหนูทุกวันในเวลาเดียวกันก่อนป้อนน้ำกลั่น หรือสารละลายบอแรกซ์ นำน้ำหนักหนูเฉลี่ยในวันที่ 1, 8, 15, 22, 30 ก่อนทำ partial hepatectomy หรือ sham operation และในวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 7 หลังทำ partial hepatectomy หรือ sham operation มาเขียนกราฟ

2.3 การศึกษาอัตราการงอกขยายการเปลี่ยนแปลงของเซลตับ

บันทึกน้ำหนักตับจากหนูที่ฆ่าในวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 7 หลังทำ partial hepatectomy หรือ sham operation นำน้ำหนักตับเฉลี่ยมาเขียนกราฟ

นำเนื้อตับส่วนหนึ่งไป fix ด้วย 10% ฟอร์มาลิน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปทำ paraffin section หนา 5μ ย้อมด้วยสี haematoxylin-eosin เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลตับและวัดค่า mitotic index

mitotic index = จำนวน mitotic nuclei /1,000 nucleic observed

นับ nuclei 10,000 nuclei ว่ามี mitotic nuclei อยู่เท่าไร แล้วหารด้วย 10 จะได้ค่า mitotic index

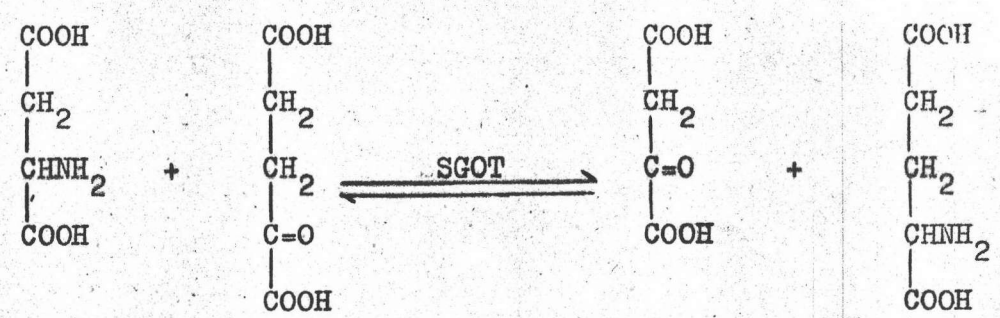
นำเนื้อตับอีกส่วนหนึ่งไป fix ด้วย 95% เอทธานอลแล้วนำไปทำ paraffin section หนา 5μ ย้อมด้วยสี Periodic Acid Schiff (PAS) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ PAS positive granules ในเซลตับ

2.4 การศึกษาระดับ Serum transaminase (Reitman and Frankel, 1957)

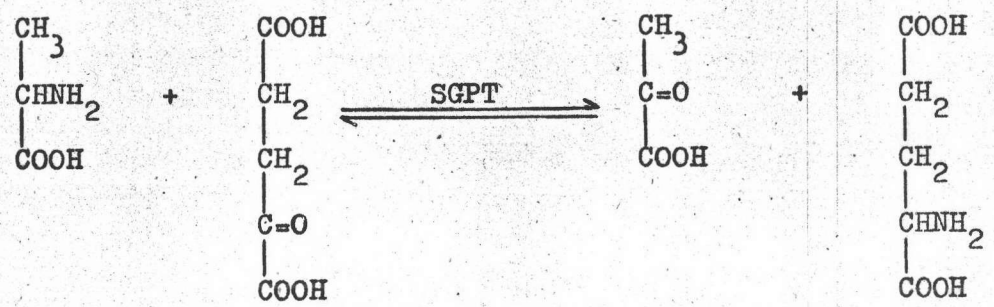
ใช้ serum ชุดเดียวกับที่ใช้หากลูโคส

หลักการ

transaminase เป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย้าย amino group จาก amino acid ไปให้ α-keto acid ในการวินิจฉัยโรคเกี่ยวกับตับนิยมวัด ปริมาณ transaminase 2 ตัวคือ Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT) และ Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT) ถ้าเนื้อเยื่อที่มี enzyme เหล่านี้ถูกทำลาย จะทำให้มี transaminase หลั่งออกมาอยู่ในกระแสโลหิตได้มาก



L-Aspartic acid Ketoglutaric acid Oxaloacetic acid Glutamic acid



Alanine acid Ketoglutaric acid Pyruvic acid Glutamic acid

Oxaloacetie และ Pyruvic acid จะทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine ได้เป็น phenylhydrazone (จากสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง)

สารเคมี

1. 0.1 M. Phosphate buffer pH 7.4 เตรียมโดยการผสม 0.1M disodium phosphate 420 มิลลิลิตรกับ 0.1 M. potassium dihydrogen phosphate 80 มิลลิลิตร

2. pyruvate 2 mM ต่อลิตร (สำหรับทำ standard curve) เตรียมโดยการละลาย sodium pyruvate 2 มิลลิกรัมใน phosphate buffer 100 มิลลิลิตร

3. α-ketoglutarate 2 mM ต่อลิตร d,l-aspartate 200 mM ต่อลิตร (สำหรับการวัด SGOT) เตรียมโดยการใส่ α-ketoglutaric acid 29.2 มิลลิกรัม และ d,l-aspartic acid 2.66 กรัมลงใน beaker เติม sodium hydroxide จนกระทั่งสารทั้งสองละลายหมด ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย sodium hydroxide ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม buffer จนกระทั่ง ปริมาตร

รวมเป็น 100 มิลลิลิตร

5. 2,4- dinitrophenylhydrazine 1 mM ต่อลิตร เตรียมโดยการละลาย 2,4-dinitrophenylhydrazine 19.8 มิลลิกรัมใน 1N. HCl 100 มิลลิลิตร

6. 0.4 N sodium hydroxide solution เตรียมโดยการละลาย sodium hydroxide 16 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

วิธีการ

ดูด serum 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดแก้วทดลอง

เติม substrate (α-ketoglutarate และ d,l-aspartate สำหรับหา SGOT, α-ketoglutarate และ d,l-alanine สำหรับหา SGPT) 0.25 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วทดลอง เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที สำหรับการหา SGOT และ 60 นาทีสำหรับการหา SGPT

เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว เอาหลอดแก้วทดลองขึ้นจากอ่างน้ำ เติม 2,4-dinitrophenylhydrazine 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 0.4 N NaOH 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่นที่ 505 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank เทียบกับ standard curve

การเตรียม standard curve

เตรียมหลอดแก้วทดลองดังนี้

หลอดที่	pyruvate solution (มล.)	substrate (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)	OD หรือ %T 505 nm	SGOT activity 37°C (I.U)	SGPT activity 37°C (I.U)
1	0	1.0	0.2		0	0
2	0.1	0.9	0.2		14	28
3	0.2	0.8	0.2		61	57
4	0.3	0.7	0.2		114	97
5	0.4	0.6	0.2		190	-

เติม 2,4-diphenylhydrazine 0.25 มิลลิลิตร

เติม 0.4N NaOH 2.5 มิลลิลิตร

อ่านค่า OD หรือ %T ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 505 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

นำค่า OD และ activity ไปเขียนกราฟโดยใช้กระดาษกราฟธรรมดา หรือนำค่า %T และ activity ไปเขียนกราฟโดยใช้กระดาษ semilog graph

2.5 การศึกษาระดับ bilirubin ในเลือด

ใช้ serum ชุดเดียวกับที่ใช้หากลูโคส

หลักการ

bilirubin ในกระแสเลือดส่วนใหญ่เกิดขึ้นเนื่องจากการแตกทำลาย ของเม็ดเลือดแดงตามช่วงอายุ (ประมาณ 120 วัน) bilirubin จะมีระดับสูงขึ้น ในภาวะที่เป็นโรคบางชนิด เมื่อเม็ดเลือดแดงถูก reticuloendothelial system ทำลาย bilirubin จะไหลไปตามกระแสโลหิตโดยเกาะรวมกับ protein เป็น indirect bilirubin หรือ free bilirubin เข้าสู่ตับ ในตับ indirect bilirubin จะถูกแยกออกแล้วเปลี่ยนให้เป็น conjugated bilirubin หรือ direct bilirubin โดยการรวมตัวกับ glucuronic acid จากนั้นจะถูกขับออกจากเซลตับเข้าสู่ biliary tree กลายเป็นส่วนหนึ่งของ bile ซึ่งเคลื่อนต่อไปสู่ duodenum

bilirubin ใน serum จะทำปฏิกิริยากับ diazotized sulfanilic acid (Ehrich's diazo reagent) ได้สารละลายสีม่วงแดงของ azobilirubin

สารเคมี

1. absolute methanol AR grade

2. 1.5% HCl เตรียมโดยการใช้ conc. HCl 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร

3. 0.1% sulfanilic acid ละลาย sulfanilic acid100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น เติม conc. HCl 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร

4. 5% sodium nitrite ละลาย sodium nitrite 5 กรัมด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น ใช้เป็น stock standard

5. 0.5% sodium nitrite ใช้ stock 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ควรเตรียมใหม่ๆ)

6. Working diazo reagent ใช้ 0.1% sulfanilic acid 10 มิลลิลิตรต่อ 0.5% sodium nitrite 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำ)

7. bilirubin stock solution ชั่ง bilirubin powder 50 มิลลิกรัม ละลายด้วย chloroform แล้วเติม chloroform ให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร

8. bilirubin working standard ใช้ stock 2.0 มิลลิลิตร เติม methanol ให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

ดูด serum 0.2 มิลลิลิตรใส่ลงใน cuvettes 2 อัน อันหนึ่งใช้เตรียม blank อีกอันหนึ่งใช้เตรียม unknown เติมน้ำกลั่น 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

เติม 1.5% HCl 0.5 มิลลิลิตร ลงใน cuvette ที่ใช้เป็น blank

เติม diazo reagent 0.5 มิลลิลิตร ลงใน cuvettes ที่ใช้เป็น unknown

เมื่อครบ 1 นาที อ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่นที่ 540 nm ค่าที่ได้เป็นค่า direct bilirubin

สำหรับการหาค่า total bilirubin เติม methanol อีก 2.5 มิลลิลิตร ทั้งใน blank และ unknown เขย่าให้เข้ากัน

หลังจากนั้น 20 นาที นำไปอ่านค่า OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 540 nm เทียบกับ standard curve

การเตรียม

เตรียมหลอดแก้วทดลองดังนี้

หลอดที่	bilirubin working standard (มล.)	methanol (มล.)	มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ของ bilirubin
1	5.0	-	10.0
2	3.0	2.0	6.0

หลอดที่	bilirubin working standard (มล.)	methanol (มล.)	มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ของ bilirubin
3	1.0	4.0	2.0
4	0.5	4.5	1.0
5	0.25	4.75	0.5
6	0.1	4.9	0.2
7 (blank)	-	5.0	0

เติม diazo reagent 1.0 มิลลิลิตรลงในทุกหลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปวัด OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 540 nm นำค่า OD และจำนวน bilirubin ไปเขียนกราฟ

ค่าที่ได้จากกราฟเป็นค่าของ direct bilirubin สำหรับ total bilirubin อ่านจากกราฟเดียวกัน แต่ค่าที่ได้ต้องคูณด้วย 2 เพราะว่ามีจำนวนเป็น 1/2 เท่าของ direct bilirubin

2.6 การศึกษา specific activity ของเอ็นไซม์ alcohol dehydrogenase ในตับ (Greenberger et al, 1965)

ใช้หนู 5 ชุดๆ ละ 6 ตัว

ชุดที่ 1 ใช้หนูจากกลุ่มที่ 1 ในวันที่ 1

ชุดที่ 2 ใช้หนูจากกลุ่มที่ 1 ในวันที่ 15

ชุดที่ 3 ใช้หนูจากกลุ่มที่ 1 ในวันที่ 30

ชุดที่ 4 ใช้หนูจากกลุ่มที่ 4 ในวันที่ 15

ชุดที่ 5 ใช้หนูจากกลุ่มที่ 4 ในวันที่ 30

หลังป้อนหนูด้วยน้ำกลั่นหรือสารละลายบอแรกซ์ครั้งสุดท้ายแล้ว 4 ชั่วโมง นำมาฆ่าโดยวิธี cervical dislocation ผ่าหน้าท้องแล้วตัดตับออกโดยเร็ว ชั่งตับ 1 กรัม ใส่ลงไปใน 0.1M phosphate buffer ที่เย็นจัดนำไปบดด้วย Potter-Elvehjem homogenizer ใช้ความเร็ว 2,300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาทีนำ homogenate ที่ได้ไป centrifuge ใน Hitachi model 65 P. preparative ultracentrifuge

ที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที เก็บ supernate ไว้ นำไปปั่นต่อที่ความเร็ว 100,000 g อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 60 นาที supernate ที่ได้นำไปใช้หา ADH activity

หลักการ :

$$\text{acetaldehyde} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{ADH}} \text{ethanol} + \text{NAD}^+$$

การลดลงของ NADH ซึ่งวัดได้จากค่า OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 340nm ที่ลดลงจะใช้เป็นดัชนีของค่า ADH activity ได้ อัตราการลดลงของ OD จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลาในช่วง 3 นาทีแรก

สารเคมี

1. 0.1 M phosphate buffer pH 7.2
2. 0.5 mole NADH
3. 0.1 M acetaldehyde

วิธีการ :

การหา ADH activity ทำในquartz cuvette ซึ่งใส่

0.1 M phosphate buffer pH 7.2	2.0 มิลลิลิตร
Liver supernate	0.1 "
0.5μ mole NADH	0.2 "
0.1 M acetaldehyde	0.1 "

สำหรับ 0.1 M acetaldehyde ใช้เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยาจึงใส่หลังสุด quartz cuvettes ต้องควบคุมให้มีอุณหภูมิ 30°ซ. โดยใช้ circulating water bath วัด OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 340nm โดยใช้ Gilford spectrophotometer model 2400-2 reagent blank สำหรับ set zero ประกอบด้วย

0.1 M phosphate buffer pH 7.2	2.0 มิลลิลิตร	
0.1 M phosphate buffer pH 7.2	0.1 "	แทนliver supernate
0.1 M phosphate buffer pH 7.2	0.2 "	" NADH
0.1 M acetaldehyde	0.1 "	

sample blank ประกอบด้วย

0.1 M phosphate buffer pH 7.2 2.0 มิลลิลิตร

liver supernate 0.1 มิลลิลิตร

0.1 M phosphate buffer pH 7.2 0.2 มิลลิลิตรแทนNADH

0.1 M phosphate buffer pH 7.2 0.1 มิลลิลิตรแทนacetaldehyde

ค่า OD ของ unknown ที่วัดได้ต้องหักออกด้วยค่า sample blank ก่อนทุกครั้งที่จะนำไปคำนวณหาค่า ADH activity

การเตรียม standard curve

ใช้ 0.1 M phosphate buffer 2.2, 2.25, 2.30, 2.35, 2.40 มิลลิลิตรผสมกับ 0.5 μmole NADH 0.2, 0.15, 0.10, 0.05, 0 มิลลิลิตรตามลำดับเขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 340 nm

นำค่า OD ที่อ่านได้ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 340nm คูณμmoleNADHไปเขียนกราฟ

จากการเปลี่ยนแปลงในค่า OD ต่อนาทีของunknown นำไปเทียบกับ standard curve เป็นμmole NADH ต่อนาที ก็จะเทียบหาค่า enzyme activity ออกมาได้

enzyme activity = จำนวนเอ็นไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน substrate 1.0μ mole ให้เป็น product 1.0μ mole ในเวลา 1 นาทีในสภาพที่เหมาะสม

specific activity = enzyme activity ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในliver supernate

<u>การหาโปรตีนโดยวิธี Biuret</u> (Gornell <u>et al</u>, 1949)

หลักการ

สาร Biuret คือสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับ alkali copper reagent ซึ่งได้แก่

1. สารที่มีหมู่ $-CONH_2$ 2 หมู่ $-CH_2NH_2$ 2 หมู่ $-C(NH)(NH_2)$ หมู่หรือ $CSNH_2$ 2 หมู่จับกับ C หรือ N

2. peptide structure ซึ่งมีอย่างน้อย2peptide linkage

สารจำพวก peptide หรือโปรตีนจะเปลี่ยนสี alkali copper reagent

จากสีฟ้าเป็นสีน้ำเงิน

Biuret reagent:

เตรียมโดยการละลาย cupric sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 1.5 กรัมและ sodium potassium tartrate ($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) 6 กรัมด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม 10% sodium hydroxide 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น ให้ปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร

ใช้ biuret reagent 4 มิลลิลิตร ต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตรของ unknown ซึ่งมีโปรตีน 1 - 10 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20-25°ซ) แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 550 nm

blank ใช้ Biuret reagent 4 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียม standard curve:

เตรียม standard BSA (Bovine Serum Albumin) ให้มี BSA 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติม Biuret 4 มิลลิลิตรต่อ standard BSA solution 1 มิลลิลิตร นำค่า OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 550 ที่อ่านได้ กับจำนวนของ BSA ไปเขียนกราฟ

2.7 <u>การศึกษาระดับเอทธานอลในเลือด</u>

ใช้หนูจากกลุ่มที่ 3 และ 5 หลังจากป้อนเอทธานอลแล้วทำการเจาะเลือดในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 4 และ 6 จาก orbital sinus ครั้งละ 0.6 มิลลิลิตร เก็บในหลอดแก้วทดลองที่ใส่สารกันเลือดแข็งตัว (ประกอบด้วย sodium fluoride lithium oxalate และ thymol) ปิดผนึกด้วย parafilm เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ ก่อนนำไปหาระดับเอทธานอลในเลือดโดยใช้ Blutalkohol® ของ Boehringer Mannheim GMBH. Germany

หลักการ

ADH catalyse ปฏิกิริยา: $C_2H_5OH + NAD^+ \xrightarrow{ADH} CH_3CHO + NADH + H^+$

จำนวน NADH ที่เกิดขึ้นซึ่งวัดได้จาก OD ที่ความยาวช่วงคลื่น 340 nm จะเป็น

สัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเอทธานอล

สารเคมี

1. solution 1 ประกอบด้วย 75 mM pyrophosphate buffer pH 8.7, 75 mM semicarbazide , 21 mM glycine ละลายด้วยน้ำกลั่น ซึ่งได้ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง จำนวน 350 มิลลิลิตร

2. solution 2 ประกอบด้วย 24 mM NAD ละลายในน้ำกลั่น ซึ่งได้ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง จำนวน 3.0 มิลลิลิตร

3. solution 3 ประกอบด้วย ADH 8,000 หน่วยต่อ 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นซึ่งได้ผ่านการกลั่น 2 ครั้งจำนวน 0.5 มิลลิลิตร

4. perchloric acid ($HClO_4$) 0.33 N เตรียมโดยใช้ stock 70% จำนวน 28.36 มิลลิลิตร ผสมด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งให้มีปริมาตรรวมเป็น 1,000 มิลลิลิตร

5. ethanol calibration solution (standard solution a-d) ซึ่งมีเอทธานอล 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร

วิธีการ

การตกตะกอนโปรตีนทำได้โดยดูด $HClO_4$ ที่เย็นจัดใส่ลงไปใน centrifuge tube ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม standard solution (a-d) และ unknown ลงไปหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยแท่งแก้ว ปิด centrifuge tube ด้วยจุกยาง นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูด supernate ถ่ายใส่หลอดแก้วทดลอง ปิดด้วยจุกยาง

หลอดแก้วทดลองที่ใช้หา unknown ประกอบด้วย

solution 1	4.80 มิลลิลิตร
solution 2	0.10 "
supernate	0.10 "
solution 3	0.02 "

หลอดแก้วทดลองที่ใช้เป็น blank ประกอบด้วย

solution 1	4.80 มิลลิลิตร

solution 2	0.10 มิลลิลิตร
$HClO_4$ 0.33 N	0.10 "
solution 3	0.02 "

หลอดแก้วทดลองที่ใช้เป็น standard ประกอบด้วย

solution 1	4.80 มิลลิลิตร
solution 2	0.10 "
standard solution (a-d)	0.10 "
solution 3	0.02 "

เขย่าสารในหลอดแก้วทดลองทุกหลอดให้เข้ากัน ปิดหลอดแก้วทดลองด้วยจุกยาง นำไปแช่ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำไปวัดค่า ที่ความยาวคลื่นที่ 340 nm เทียบค่า unknown กับ standard curve

2.8 การศึกษา glucose tolerance test (Ida et al, 1975)

ใช้หนูกลุ่มที่ 2 และ 4 ก่อนวันที่จะป้อนน้ำกลั่นหรือสารละลายบอแรกซ์ ครั้งสุดท้าย 1 วัน กลุ่มละ 6 ตัว ทำการอดอาหารให้กินแต่น้ำประปาอย่างเดียวเป็นเวลา 16ชั่วโมงแล้วจึงป้อนน้ำกลั่นหรือสารละลายบอแรกซ์ 2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม หลังจากนั้น 4 ชั่วโมงทำ partial hepatectomy อีก 2 ชั่วโมงต่อมาป้อนสารละลายกลูโคส200 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม แล้วทำการเจาะเลือดจากหางหนู 0.2 มิลลิลิตร ในช่วงเวลา 0, 15, 45, 90, 180 และ 360 นาทีหลังป้อนสารละลายกลูโคส ถ่ายเลือดใส่ลงในหลอดแก้วทดลองที่ใส่สารกันเลือดแข็งตัว ปิดผนึกด้วย parafilm เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ ก่อนนำไปหาระดับกลูโคสในเลือดโดยวิธีเดียวกันกับการศึกษาระดับกลูโคสในเลือด แต่ใช้เลือด 0.1 มิลลิลิตร แทน serum

2.9 การศึกษาระดับกลูโคสในเลือด

เจาะเลือดจากหัวใจหนูทุกกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3 และ 7 หลังทำpartial hepatectomy หรือ sham operation ถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด10 มิลลิลิตร ปิดผนึกด้วย parafilm ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20-25°ซ) 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เก็บ serum ไว้หาระดับกลูโคส

หลักการ

aldosaccharide ทำปฏิกิริยากับ O-toluidine ใน glacial acetic acid เกิดเป็นสารละลายสีเขียนปนฟ้า

สารเคมี

1. trichloroacetic acid (TCA 3% w/v)

2. color reagent เตรียมโดยการใช้ thiourea 3 กรัม ละลายใน glacialacetic acid 1,500 มิลลิลิตร เติม O-toluidine 120 มิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอดสีชา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วันก็ใช้ได้

3. Benzoic acid solution 0.2%

4. Glucose standard 500, 400, 300, 200 และ 100 มิลลิกรัม ใน benzoic acid solution 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

ดูด seurm 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน TCA solution 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที

ดูด supernate 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วทดลอง เติมcolor reagent 4.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

แช่หลอดแก้วทดลองลงในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที เมื่อครบ 8 นาทีแล้วเอาออก ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

วัดสีเขียวปนฟ้าที่เกิดขึ้นที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 630 nm เทียบกับ standard curve

blank ใช้ TCA 0.5 มิลลิลิตรผสมกับ color reagent4.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน แช่หลอดแก้วทดลองลงในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาทีเหมือนกับ unknown

การเตรียม standard curve

ดูด standard glucose 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน TCA solution1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ดูดสารละลายที่ได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วทดลองเติม color reagent 4.5 มิลลิลิตร แล้วทำต่อไปเช่นเดียวกันกับ unknown

นำค่า OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 630nm กับปริมาณกลูโคสไปเขียนกราฟ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

2.10 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอัณฑะ

บันทึกน้ำหนักอัณฑะจากหนูที่ฆ่าในวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 7 หลังทำ partial hepatectomy หรือ sham operation นำน้ำหนักอัณฑะเฉลี่ยมาเขียนกราฟ

นำอัณฑะไป fix ด้วย 10% ฟอร์มาลิน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปทำ paraffin section หนา 5μ ย้อมด้วยสี haematoxylin-eosin

2.11 การศึกษาเวลาแข็งตัวของเลือด (ธรรมศักดิ์, 2516)

ใช้เลือดจากหนูทุกกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 7 หลังทำ partial hepatectomy หรือ sham operation

หลักการ

ปกติเมื่อเลือดออกมาอยู่นอกหลอดเลือดและสัมผัสกับผิวที่ไม่เรียบ เลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งแข็งตัวเป็นลิ่ม เวลาตั้งแต่เลือดเริ่มสัมผัสกับผิวที่ไม่เรียบ จนกระทั่งเกิดการแข็งตัวของเลือดคือเวลาแข็งตัวของเลือด

วิธีวัดเวลาแข็งตัวของเลือดโดยวิธี micro method

ตัดปลายหางหนู แตะปลาย capillary tube ชนิดที่ไม่ได้ฉาบสารกันเลือดแข็งตัวเข้ากับแผล เลือดจะไหลเข้า capillary tube โดยอาศัยแรงดูดจาก capillary tube ทิ้ง capillary tube ไว้ 30 วินาที เริ่มหัก capillary tube ทุกๆ 10 วินาทีต่อไป จนเริ่มมีเส้นใยของ fibrin เกิดขึ้นถ้ามีเส้นใย fibrin เกิดขึ้นแล้วก็ให้หักก่อนช่วง 30 วินาที จนกระทั่งพบจุดที่เริ่มมี fibrin เกิดขึ้น

2.12 การศึกษาปริมาณโบรอนในเนื้อเยื่อ (Kaczmarczyk et al, 1971)

ใช้หนูกลุ่มที่ 4 และ 5 เมื่อป้อนสารละลายบอแรกซ์ครบ 30 วัน และหลังทำ partial hepatectomy 1 วัน เก็บสมอง ตับ ไต อัณฑะ และ serum ไว้ ที่อุณหภูมิ -40°ซ. ก่อนนำไปหาปริมาณโบรอน

หลักการ

โบรอนจะทำปฏิกิริยากับ 1,1' dianthrimide ใน conc. H_2SO_4 ทำให้สารละลายของ 1,1' dianthrimide ใน conc. H_2SO_4 เปลี่ยนจากสีเขียนอ่อนเป็นสีน้ำเงิน

สารเคมี

1. Boric acid AR grade
2. 90% H_2O_2 (v/v)
3. $Ca(OH)_2$
4. conc. H_2SO_4
5. saturated aqueous $SnCl_2$
6. สารละลาย 1,1' dianthrimide ที่เตรียมใหม่ๆ โดยการละลาย 1,1 dianthrimide 33.3 มิลลิกรัม ด้วย conc. H_2SO_4 ให้ปริมาตรรวมเป็น 200 มิลลิลิตร

วิธีการ

ใช้เนื้อเยื่อหรือ serum น้ำหนักไม่เกิน 500 มิลลิกรัม ซึ่งมีโบรอน 1-5 ไมโครกรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม $Ca(OH)_2$ 10 มิลลิกรัม เติม conc. H_2SO_4 4 มิลลิลิตร ใส่ magnetic bar ลงไป นำไปตั้งใน liquid paraffin bath อุณหภูมิ 126°ซ. บน magnetic-heating stirrir เป็นเวลา 25 นาที เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม 90% H_2O_2 (v/v) ที่ละหยด พร้อมทั้งเขย่าจนกระทั่งครบ 15 หยด นำกลับไปแช่ใน liquid paraffin bath อีกเป็นเวลา 20 นาที เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติม H_2O_2 เช่นเดียวกับครั้งแรก นำกลับไปแช่ใน liquid paraffin bath อีก 20 นาที เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม saturated aqueous $SnCl_2$ 3 หยดเพื่อทำลาย H_2O_2 ที่ยังเหลืออยู่ แล้วเติมสารละลาย 1,1' dianthrimide 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปใส่ในตู้อบอุณหภูมิ 110°ซ. เป็นเวลา 17 นาที เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัด OD ที่ความยาวช่วงคลื่นที่ 620 nm เทียบกับ standard curve

การเตรียม standard curve

ละลาย boric acid 116.5 มิลลิกรัมโดยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 200 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้จะมีโบรอน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เอา stock ที่ได้ 4, 3 2 และ 1 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ สารละลาย

ที่มีโบรอน 4, 3, 2 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดูดสารละลายโบรอน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน **volumetric flask** ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม $Ca(OH)_2$ ลงไป 10 มิลลิกรัม นำไประเหยน้ำออกในตู้อบอุณหภูมิ 80-90°ซ. จะได้ **standard calcium borate** สำหรับ **blank** ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และ $Ca(OH)_2$ 10 มิลลิกรัมแทนสารละลายโบรอน นำไประเหยน้ำออกเช่นเดียวกัน เติม **conc.** H_2SO_4 ลงไป 4 มิลลิลิตร แล้วทำต่อไปเช่นเดียวกันในการทำ **unknown** นำค่า OD ที่ความยาวคลื่นที่ 620 **nm** กับจำนวนโบรอนไปเขียนกราฟ