บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

หนูแฮมสเตอร์เลี้ยงในห้องทดลองของ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย อยู่ในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงสว่าง 14 ชั่วโมง (ตั้งแต่เวลา 06.00-20.00 น.)และมืด 10 ชั่วโมง (ตั้งแต่เวลา 20.00-06.00 น.) โดยใช้สวิทช์อัตโนมัติ กินอาหารมาตรฐานจากบริษัท F.E.Znelling (Gold Coil miels) และมีน้ำดื่มตลอดเวลา เลือกใช้แฮมสเตอร์เพศผู้ที่มีอายุประมาณ 3 เดือน น้ำหนักประมาณ 100-150 กรัม จำนวน 78 ตัว

2. ฮอร์โมนและสารเคมี

2.1 ฮอร์โมนและแอนติบอดี

Adrenocorticotropic hormone(ACTH) : A 6303 lot H 0004, Slgmal Chemical Company, U.S.A.

Cortisol antisera batch W.K 907010 : WHO RIA reagent programme Switzerland.

Cortisol standard (60 nmol/l) batch K 079510 : WHO RIA reagent programme, Switzerland.

[1,2,6,7^3 H] Cortisol, TRK 407, Batch 46 : WHO RIA reagent programme, Switzerland.

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

Bovine Serum albumin essential fatty acid free : A-0281 lot 10 H 9304, Sigma Chemical Company,U.S.A.

Linoleic acid : L-5900 lot 44 H 1059, Sigma Chemical Company,U.S.A.

Medium M 199 : Cat no 40-1000 E.B.,Sigma Chemical Company,U.S.A.

Oleic acid : O-1257 lot 93 H 1106,Sigma Chemical Company,U.S.A.

Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) : E Merk, Germany.

Streptozotocin : S-0130, lot 25 H 0471, Sigma Chemical Company,U.S.A.

2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน ด้วยวิธีเรดิโอ-อิมมิวโนเอสเสย์ (RIA)

Charcoal reagent batch no 22052 : WHO RIA reagent programme,Switzerland.

Dextran reagent batch no 82-83 S : WHO RIA reagent programme,Switzerland.

Diethyl ether : E Merk, Germany.

Dioxane : E Merk, Germany.

Disodium hydrogen phosphate : E Merk, Germany.

Ethanol : E Merk, Germany.

Gelatin : Difco Laboratories, U.S.A.

Heparin (5000 *u*/ml) : Leo, U.S.A.

POPOP (1,4 bis [5-phenyl-2 OXA Zolyl] benzene, 2-2-P-phenylene-bis [5-phenyloxazole] : Sigma Chemical Company,U.S.A.

PPO (2,5 diphenyl oxazole) : Sigma Chemical Company,U.S.A.

Sodium Chloride : E Merk, Germany.

Sodium dihydrogen phosphate : E Merk, Germany.

Thimerosal (methiolate) : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Toluene : E Merk, Germany.

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางวิทยาฮีสโตของเนื้อเยื่อ

Bouin's fixative : Searle Company, England.

Canada balsam : L 17931 lot 423, E Merk,

Eosin Y (Yellowish) : No K 18684735, E. Merk, Germany.

Ethyl alcohol : องค์การสุรา : Thailand.

Glycerine : Difco Laboratories,U.S.A.

Hematoxylin : No K 15872738,E Merk,Germany.

N-butyl alcohol : lot 889548, Mana Baker,England.

Oil red O : E Merk, Germany.

Paraffin plast : No 8889-502004,Oxford Labwar, U.S.A.

Xylene : No K 20692881,E Merk,Germany.

<u>อุปกรณ์</u>

เครื่องมือผ่าตัด (กรรไกรปลายตรง, กรรไกรปลายโค้ง, ปากคีบ)

เครื่องชั่งละเอียด : Right a weight, W.M. Ainworth and Sons Inc., U.S.A.

American Optical Microtome : Labline instruments Inc., U.S.A.

Beta Liquid Scintillation counter (model 1218-811: Wallac, Finland.

Dri block heater (model DB-3) : Tecam Laboratory and industrial equipment,U.S.A.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Dubnoff incubator shaker (model 3575-1) : Labline instruments Inc.,U.S.A.

Dynac centrifuge : Clay-Adam, Bectom-Dlehenson Company,U.S.A.

Guillotine homogenizer (manual, model 9825 : Pyrex,U.S.A.

Magnetic stirror (model s-18520) : Thermolme Corporation,U.S.A.

Micropipette (model 3130) : Eppendorf,Germany.

Micropipette (Pipette gun) : Clay-Aams,U.S.A.

Millipore Filter (0.22 micron) : Millipore Corporation, Bed ford,U.S.A.

Oven : Cat No 3800 M, 110 Volts, Matheson scientific, Chicago

One touch monitoring blood glucose : Lifescan Johnson Johnson Company, Thailand.

PH meter (model 5985) : Cole-Parmer instrument equipment,U.S.A.

Refrigerated centrifuge (model PR-J) : International equipment Company,U.S.A.

Vortex mixer (model M-16715) : Thermolyne Corporation, U.S.A.

Warm plate 115 volts : Chyo Corporation, Japan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมการทดลอง

1. การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

ชั่ง M199 จำนวน 0.99 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วเติม streptomycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร,penicillin 100 iu/มิลลิลิตร และ $NaHCO_3$ 0.22 กรัมละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยงให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 หลังจากนั้นเติม bovine serum albumin-essential fatty acid free ปริมาณ 0.1% ลงไป นำน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เตรียมเสร็จแล้วมากรองผ่าน เมมเบรน ฟิลเตอร์ ให้ปราศจากเชื้อก่อนนำไปใช้ และเก็บไว้ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม adrenal slices

ฆ่าแฮมสเตอร์โดยวิธีดึงคอต่อ ผ่าหน้าท้องตัดเอาต่อมหมวกไตออกมา ตัดเลาะไขมัน และแคปซูลที่หุ้มอยู่ออก ล้างด้วย normal saline ให้สะอาด นำต่อมหมวกไตมาหั่นด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 4 ชิ้นเท่ากัน (Kloppenborg et al.,1968)

3. การเตรียมสารละลายสำหรับ หาปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธี RIA

3.1 buffer solution

ชั่งสารต่าง ๆ ตามจำนวนที่กำหนดดังนี้

disodium hydrogen phosphate	11.6	กรัม
gelatin	1.0	กรัม
sodium chloride	8.8	กรัม
sodium dihydrogen phosphate	3.1	กรัม
thimersol	0.1	กรัม

ละลาย gelatin ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirror และอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายเข้ากันดี ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมสารเคมีที่เหลือลงไปทีละอย่าง เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ pH อยู่ในช่วง 7.2-7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอายุใช้งาน 1 เดือน

3.2 charcoal suspension

ชั่งสารต่าง ๆ ตามจำนวนที่กำหนดดังนี้

buffer solution	100	มิลลิลิตร
charcoal reagent	0.625	กรัม
dextran reagent	0.0625	กรัม

ละลาย dextran ใน buffer solution จากข้อ 3.1 หลังจากนั้นเติม charcoal ลงไปกวนนาน 30 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลา อายุใช้งาน 1 เดือน

3.3 scintillation fluid

ชั่งสารต่าง ๆ ตามจำนวนที่กำหนดดังนี้

dioxane	200	มิลลิลิตร
POPOP	0.35	กรัม
PPO	5.5	กรัม
toluene	1000	มิลลิลิตร

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากันกวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายเข้ากันดีอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

3.4 cortisol working tracer

จาก [1,2,6,7 ^{3}H] Cortisol ซึ่งละลายอยู่ใน benzene : ethanol ในอัตราส่วน 9:1 เป็น cortisol stock tracer ที่มีความแรง 250 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร โดยการนำ cortisol stock ปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาเป่าให้แห้งด้วย air compressor จากนั้นเติม buffer solution 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixer จะได้ cortisol stock tracer ที่มีความแรง 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.5 cortisol antisera

นำ cortisol antisera จาก WHO ซึ่งอยู่ในสภาวะที่ถูกทำให้แห้ง (Lyophilized) มาเติม buffer solution 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายจนหมดจะได้ความเข้มข้น 1:210,000 เตรียมแล้วใช้ได้ทันที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.6 cortisol standard

เตรียมจากสารมาตรฐานคอร์ติซอล ซึ่งมีความเข้มข้น 6 ไมโครโมลต่อลิตร โดยนำสารมาตรฐานคอร์ติซอลปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาเติม buffer solution 10 มิลลิลิตรเขย่าเบา ๆ แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที จะได้สารละลายคอร์ติซอลที่มีความเข้มข้น 60 นาโนโมลต่อลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางแบบอนุกรม (Serial dilution) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 6000 เฟมโตโมลต่อ 100 ไมโครลิตร จนถึง 94 เฟมโตโมลต่อ 100 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 1 เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน

ตารางที่ 1 แสดงการเจือจางแบบอนุกรมของสารละลายคอร์ติซอลมาตรฐาน

ลำดับที่	สารละลายคอร์ติซอลมาตรฐาน		Buffer Solution (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (เฟมโตโมลต่อ 100ไมโครลิตร)
	ความเข้มข้นที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)		
1	Stock solution	1.0	-	6000
2	ลำดับที่ 1	1.0	1.0	3000
3	2	1.0	1.0	1500
4	3	1.0	1.0	750
5	4	1.0	1.0	375
6	5	1.0	1.0	187
7	6	1.0	1.0	94

วิธีการทดลอง

1. การทำให้แฮมสเตอร์เป็นเบาหวาน

แฮมสเตอร์จำนวน 48 ตัวแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่เลี้ยงไว้ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ให้ได้รับน้ำ และอาหารอย่างเพียงพอเป็นเวลา 5 วัน พร้อมทั้งจดบันทึกปริมาณอาหารและน้ำดื่มในแต่ละวันไว้ ก่อนทำการทดลอง 1 วัน งดน้ำ และอาหาร หนูทั้ง 2 กลุ่มเป็นเวลา 12-20 ชั่วโมง ในวันทำการทดลองเวลา 08.00 น. หนูกลุ่มแรกฉีด streptozotocin (STZ) ที่ละลายใน normal saline (NSS) ปริมาณ 50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้อง และฉีดติดต่อกัน 3 วัน ๆ ละ 1 ครั้ง ก่อนฉีดแต่ละครั้งต้องงดน้ำและอาหาร 12-20 ชั่วโมงก่อนทุกครั้ง ส่วนกลุ่มที่สองฉีดสารละลาย NSS เข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 3 วัน ๆ ละ 1 ครั้งเช่นกัน หลังจากฉีดยาแล้วให้งดน้ำ และอาหารต่อไป อีกประมาณ 4 ชั่วโมง

จึงให้อาหารตามปกติ วันต่อมาเวลา 08.00 น. ตรวจหาระดับน้ำตาลในเลือด (Fasting blood sugar) หลังจากวันที่ฉีด STZ วันแรกจนถึงวันที่ 4 แฮมสเตอร์ที่เป็นเบาหวานต้องมีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 300 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (Joyner et al.,1981) ตั้งแต่วันที่ 4-8 ให้ชั่งน้ำหนักแฮมสเตอร์ พร้อมทั้งบันทึกจำนวนอาหารและน้ำดื่มทุกวัน จนกระทั่งถึงวันที่ 8 ซึ่งเป็นวันที่นำแฮมสเตอร์มาฆ่า การกระทำกับสัตว์ทดลองในทุกกลุ่มจะใช้มาตรฐานเดียวกัน เพื่อควบคุมความเครียดให้เหมือนกัน

2. <u>การเพาะเลี้ยง adrenal slices ของแฮมสเตอร์ที่ไม่เป็นเบาหวาน และที่เป็นเบาหวาน</u>

2.1 กลุ่มที่ไม่เป็นเบาหวานใช้แฮมสเตอร์ 24 ตัว นำมาสุ่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว ในวันที่ 1-3 ฉีดสารละลาย NSS เข้าทางช่องท้องวันละครั้ง โดยต้องงดน้ำ และอาหารก่อนฉีด 12-20 ชั่วโมง แล้วนำมาฆ่าในวันที่ 8 ตัดเลาะต่อมหมวกไตออกมาชั่งน้ำหนัก และหั่นเป็นชิ้น เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิดดังนี้ คือ

(1) น้ำยาเพาะเลี้ยงธรรมดา (12 ต่อม)

(2) น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติม ACTH 10^{-6} M (12 ต่อม)

(3) น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติม ACTH 10^{-6} M และกรดโอลิอิคที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสม (12 ต่อม)

(4) น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติม ACTH 10^{-6} M และกรดไลโนลิอิคที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสม (12 ต่อม)

ทั้ง 4 กลุ่มย่อย เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วเก็บ media ไว้หาปริมาณคอร์ติซอล ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

2.2 กลุ่มที่ทำให้เป็นเบาหวาน ใช้แฮมสเตอร์ 24 ตัว นำมาสุ่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ๆละ 6 ตัว หลังจากฉีด STZ เข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำแฮมสเตอร์มาฆ่าในวันที่ 8 นำต่อมหมวกไตมาชั่งน้ำหนัก และหั่นเป็นชิ้น เลี้ยงไว้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใส่สารต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 โดยเลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเช่นกัน เก็บ media ไว้หาปริมาณคอร์ติซอล ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

3. <u>การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ACTH</u> ในการกระตุ้นการหลั่งคอร์ติซอล

นำ ACTH ความเข้มข้น 10^{-8}, 10^{-6} และ 10^{-5} M ปริมาณ 35 μl ใส่ในน้ำยาเพาะเลี้ยง โดยแต่ละความเข้มข้นจะใช้ต่อมหมวกไต 5 ต่อม (n=5) incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบรรยากาศ 5% CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บ media เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มาวัดปริมาณคอร์ติซอล เพื่อดูว่าความเข้มข้นใดที่ทำให้คอร์ติซอลหลั่งออกมามาก ก็จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

4. <u>การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดโอลิอิค และกรดไลโนลิอิค</u> ในการยับยั้งการหลั่งคอร์ติซอล

นำกรดโอลิอิค และกรดไลโนลิอิคที่ละลายได้ในน้ำ ความเข้มข้น 10^{-8}, 10^{-6} และ 10^{-5} M ปริมาณ 10 μl ใส่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี ACTH 10^{-6} M อยู่ด้วย นำมาเลี้ยง adrenal slices เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บ media เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มาวัดปริมาณคอร์ติซอล เพื่อดูว่าความเข้มข้นใดที่ทำให้คอร์ติซอลหลั่งออกมาน้อย ก็จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป แต่ละความเข้มข้นของกรดทั้ง 2 ชนิดจะใช้ต่อมหมวกไตอย่างละ 5 ต่อม (n=5)

5. <u>การศึกษาลักษณะทางวิทยาฮีสโตของเนื้อเยื่อ</u> สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ขั้นตอนดังนี้ (Gurr,1962)

(1) Fixation หลังจากฆ่าแฮมสเตอร์แล้ว นำต่อมหมวกไตทั้ง 2 ข้างออกมาทันทีตัดเลาะเนื้อเยื่อไขมันออก ใส่ใน bouin's fixative เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างออกด้วย 70 % ethyl alcohol จนสีของ fixative จางลง ถ้าไม่สามารถทำตามขั้นตอนต่อไปได้ทัน แช่เก็บไว้ใน 70% ethyl alcohol ต่อไปได้นานหลายวัน

(2) Dehydration นำชิ้นเนื้อเยื่อจาก 70 % ethyl alcohol ใส่ใน 90% ethyl alcohol 6 ชั่วโมงแล้วเปลี่ยนเป็น 95% ethyl alcohol แช่ไว้นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วแช่เนื้อเยื่อต่อไปใน n-butyl 6 ชั่วโมง

(3) Clearing นำชิ้นเนื้อเยื่อจาก n-butyl แช่ใน xylene 1 ชั่วโมง

(4) Embedding นำต่อมหมวกไตที่ผ่านขั้น clearing ใส่ใน xylene : paraffin (1:1) 1/2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ใน paraffin เหลว 2 ครั้งห่างกันครั้งละ 1 ชั่วโมง ซึ่งต้องทำในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อใส่ ใน block เหล็ก แล้วเท paraffin เหลวลงไปให้ท่วมชิ้นเนื้อเยื่อ

(5) Cutting เมื่อ paraffin แข็งตัวดีแล้วแกะ block เหล็กออกใช้มีดตัด paraffin ส่วนเกินออก แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อที่หุ้มด้วย paraffin มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีขนาด 4-6 ไมครอน เรียกว่า section จากนั้นนำ section 3-4 ส่วน มาวางบนแผ่นสไลด์ โดยใช้สารละลายไข่ขาวเป็นตัวช่วยยึดติดกับสไลด์ อาจวางแผ่นสไลด์บน hot plate ที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยทำให้ section มีการขยายตัวเต็มที่และติดกับสไลด์ได้ดีขึ้น แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
ประมาณ 1 วัน

(6) Stainning นำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อมาล้าง paraffin ออกก่อน โดยใส่ใน xylene 2 ครั้ง ตามด้วย n-butyl,95% ethyl alcohol,90% ethyl alcohol,70% ethyl alcohol และน้ำกลั่น ขั้นตอนละ 3-5 นาที แล้วนำมาย้อมสี hematoxylin นาน 10-12 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำประปาเพื่อให้ส่วนนิวเคลียสของเซลล์ติดสีน้ำเงิน ถ้าย้อมติดสีมากไปให้ล้างในน้ำยาที่มี 95% ethyl alcohol ผสมกับ HCl เพื่อล้างสีที่มากเกินไปออก แล้วแช่ต่อไปใน 70% ethyl alcohol, 90% ethyl alcohol, 95% ethy alcohol ขั้นตอนละ 3-5 นาทีเช่นกันแล้วย้อมสีที่ 2 ด้วย eosin นาน 2 วินาที เพื่อให้ไซโตพลาสซึมติดสีชมพู จากนั้นนำไปใส่ใน n-butyl และ xylene อีก 2 ครั้ง แล้วนำมา mount ด้วย canada balsam

5.1 วิธีการย้อมไขมัน (Lipid droplet) ภายในเซลล์

นำชิ้นเนื้อเยื่อต่อมหมวกไตมาใส่ในแป้นเหล็กทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอจนเนื้อเยื่อแข็งตัว นำมาตัดด้วยเครื่อง microtome โดยขณะที่ตัดอุณหภูมิต้องอยู่ที่ -20 องศาเซลเซียส นำ section มาติดบนสไลด์ แล้วนำไปย้อมใน oil red O ประมาณ 5 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วย้อมต่อด้วย hematoxylin ประมาณ 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดให้สีส่วนเกินออก นำไป mount ด้วย glycerin

6. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอล ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์</u>

นำ media ที่ได้จากการ incubate adrenal slices ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 100 ไมโครลิตร เติม buffer 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำหลอดทดลอง (Assay tube) ทั้งหมดมาเติม cortisol working tracer และ cortisol antisera อย่างละ 100 ไมโครลิตร ดังรายละเอียดตารางที่ 2 หลังจากเติม tracer และ antisera แล้วเขย่าให้เท่ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม charcoal suspension หลอดละ 200 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในถาดใส่น้ำแข็งนาน 15 นาที charcoal จะจับกับคอร์ติซอล ส่วนที่เป็น free form ส่วนที่เป็น bound form จะยังละลายอยู่ใน buffer solution แยก free form จาก bound form โดยนำสารละลายที่ได้ไปปั่น โดยใช้ refrigerated centrifuge ปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที หลังจากนั้นเท supernatant ที่มี bound form อยู่ลงใน counting vial เติม scintillation fluid 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง beta counter นาน 5 นาทีต่อ 1 vial

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารต่าง ๆ ที่เติมในหลอดทดลอง

หลอดทดลอง	Sample (ไมโครลิตร)	Buffer Solution (ไมโครลิตร)	Tracer (ไมโครลิตร)	Antisera (ไมโครลิตร)	ทิ้งไว้ที่ 4°C	Charcoal Suspension (ไมโครลิตร)
Tc	–	600	100	–	18	–
Bo	–	500	100	100	–	200
NSB	–	600	100	–	24	200
Standard	100	400	100	100	ชม	200
Sample	100	400	100	100		200

Tc = Total count

Bo = Maximum binding

NSB= Non Specific Binding

ในการทำเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ จะทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) โดยนำสารละลายมาตรฐานคอร์ติซอลที่ทำเจือจางแบบอนุกรม มาใส่ในหลอดทดลอง (Assay tube) แต่ละความเข้มข้นใช้ 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลอด โดยใช้ความเข้มข้นละ 3 หลอด (Triplication) หลังจากนั้นเติม buffer solution, tracer และ antisera เช่นเดียวกับในหลอดตัวอย่าง

คำนวณผลจาก เรดิโออิมมูโนเอสเสย์ โดยนำค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ (Count Per Minute : CPM) ของแต่ละ vial ซึ่งทำซ้ำกันอย่างน้อย 2 vial สำหรับสารละลายตัวอย่าง และ 3 vial สำหรับ total count, non specific binding และสารละลายคอร์ติซอลมาตรฐาน มาหาค่าเฉลี่ยแล้วหักออกด้วย ค่า CPM เฉลี่ยของ non

specific binding ทุกตัวอย่าง ยกเว้น total count หลังจากนั้นเขียนกราฟบน semi-logarithm ระหว่าง CPM เฉลี่ยของสารมาตรฐาน กับ log ความเข้มข้นของฮอร์โมนมาตรฐาน ซึ่งกราฟดังกล่าวสามารถอ่านค่า ปริมาณคอร์ติซอลจากค่า CPM ของสารตัวอย่างได้

ความเชื่อถือของวิธีการที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอล ประเมินได้จาก ความจำเพาะ (Specificity), ความแม่นยำ (Precision), ความถูกต้อง (Accuracy) และความไวในการวิเคราะห์ (Sensitivity) โดยยึดหลักการของ Ekins (1970) และ Abraham (1974) ดังนี้

<u>ความจำเพาะ</u> หมายถึง ความสามารถของแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกริยากับฮอร์โมนได้กี่เปอร์เซ็นต์ และสามารถทำปฏิกริยากับสารอื่น ๆ ที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ได้มากน้อยเพียงใด ถ้าแอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะสูงก็จะทำปฏิกริยากับฮอร์โมนนั้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และจะไม่ทำปฏิกริยากับฮอร์โมนอื่นที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งความจำเพาะของแอนติบอดีหาได้โดยการใช้แอนติบอดีนั้น ทำปฏิกริยากับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ พร้อมกับฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วหาความจำเพาะของแอนติบอดีโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ Cross reaction ดังนี้

$$\% \text{ Cross reaction} = \frac{\text{ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกริยากับแอนติบอดีได้ 50\%}}{\text{ปริมาณสารมาตรฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทำปฏิกริยากับแอนติบอดีที่ 50 \%}}$$

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อคอร์ติซอลที่ศึกษาและสารอื่นที่นำมาตรวจสอบ (Suff, Donaldson and Jeffcoate, 1986)

ฮอร์โมน	% Cross reaction
Cortisol	100.00
Cortisone	0.10
Corticosterone	9.20
11 Deoxycortisol	27.10
Progesterone	0.20
17 α- Hydroxyprogesterone	0.80
11 α- Hydroxyprogesterone	0.07
Testosterone	0.08

ความแม่นยำ เป็นการตรวจสอบ ความสามารถในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่างชนิดหนึ่ง ๆ ซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง แล้วค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน ค่าความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน (Intra-assay) และค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง (Inter-assay) ทำได้โดยการนำสารควบคุมคุณภาพ (Pools media) 3 ระดับ คือ ค่าสูง ค่าปกติ และค่าต่ำมาวัดหาปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่าง ทำซ้ำอย่างน้อย 10 ครั้ง เพื่อหาความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน และทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละครั้งที่ทำการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน เพื่อนำมาคำนวณหาค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง การแสดงค่าความแม่นยำจะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% Co-efficient of variance หรือ % CV) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร (SD)}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต (X)}} \times 100$$

ตารางที่ 4 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณคอร์ติซอลในการตรวจวัดครั้งเดียว และการตรวจวัดในแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	การตรวจวัดในครั้งเดียวกัน		การตรวจวัดในแต่ละครั้ง	
	X±SD (fmol/tube)	% CV	X±SD (fmol/tube)	% CV
ระดับสูง	936.25±59.20	6.32	–	–
ระดับปกติ	405.83±12.78	3.15	393.33±42.69	10.85
ระดับต่ำ	207.50±11.32	5.45	–	–

ความถูกต้อง เป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนเติมลงในสารตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นของฮอร์โมนแน่นอน แล้วไปผ่านการตรวจวัด พร้อมกับสารตัวอย่างแล้วเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นที่ได้ กับปริมาณความเข้มข้นจริงที่ทราบ คำนวณค่าความถูกต้องจากสูตรดังนี้

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนที่ใส่ลงไปจริง}} \times 100$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงค่าความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณคอร์ติซอล

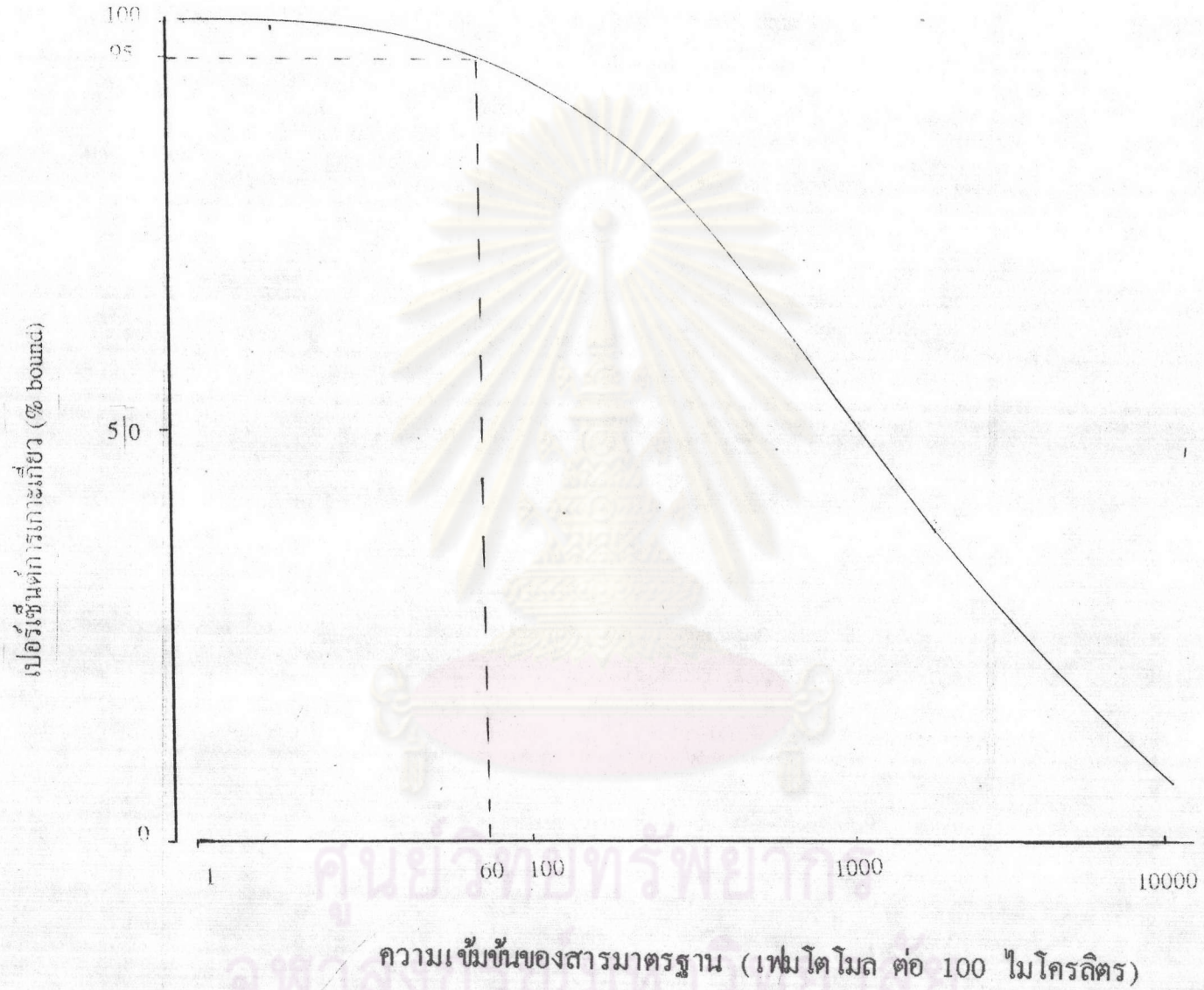
สารควบคุมคุณภาพ	ค่าจริง (fmol/tube)	ค่าจากการตรวจวัด (fmol/tube)	% ความถูกต้อง
ระดับสูง	950.00	850.54	89.53
ระดับกลาง	450.00	412.32	91.62
ระดับต่ำ	200.00	178.20	89.10

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึง ค่าที่น้อยที่สุดของสารที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ซึ่งเป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารมาตรฐาน ทำให้ได้ค่าที่น้อยที่สุด ซึ่งสามารถแยกออกจากค่าศูนย์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ทำได้โดยการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนความเข้มข้นศูนย์ (Blank) และสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเดียวกับความเข้มข้นที่นำมาทำกราฟมาตรฐาน โดยจะทำซ้ำ 10 ครั้ง และนำค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นทั้ง 10 ครั้งมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน semi-logarithm โดยให้แกน X เป็นเปอร์เซ็นต์ การเกาะเกี่ยว (% Bound) และแกน Y คือ log ของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ซึ่งความเข้มข้นที่ระดับเปอร์เซ็นต์เกาะเกี่ยวเท่ากับ 95 จะเป็นความไวของการวิเคราะห์

เปอร์เซ็นต์เกาะเกี่ยวหาได้จาก

$$\% \text{ Bound} = \frac{\text{ค่า CPM เฉลี่ยของสารมาตรฐาน - NSB}}{\text{ค่า CPM เฉลี่ย Bo - NSB}} \times 100$$

ค่าความไวของการวัดฮอร์โมนนี้ มีค่าเท่ากับ 60 เฟมโตโมลต่อ 100 ไมโครลิตร หรือ พิโกโมลต่อลิตร (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงค่าความไวในการวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอล

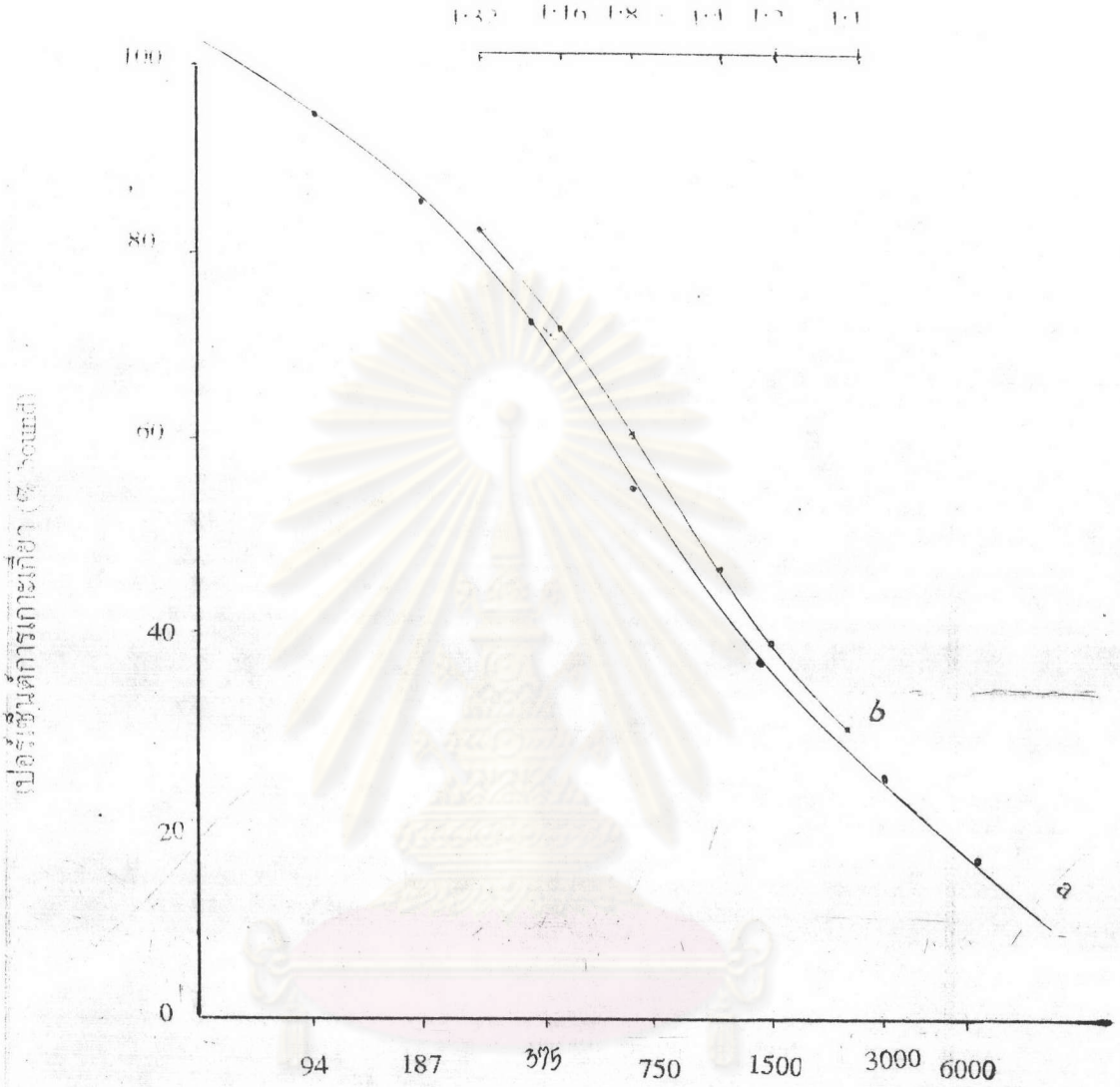
การหาปริมาณคอร์ติซอลใน media จาก adrenal slices ของแฮมสเตอร์โดยใช้ฮอร์โมน และแอนติบอดีของ WHO ซึ่งทำไว้สำหรับใช้ในคน แต่ได้ทำการทดสอบว่า ใช้กับ media จาก adernal slices ได้โดยการทำ parallellism ดังนี้

เนื่องจากการวัดปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธี เรดิโออิมมูโนเอสเสย์ เป็นการเปรียบเทียบปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในสารตัวอย่าง ถ้าปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในสารมาตรฐาน กับสารตัวอย่างแตกต่างกันจะเป็นผลให้ความแม่นยำในการวัดไม่ดี ซึ่งเป็นผลต่อเนื่อง ทำให้ความถูกต้องในการวัดไม่ดีด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้ ซึ่งใช้ฮอร์โมนและแอนติบอดีที่ใช้ได้ดีในซีรัมคน นำมาใช้กับ media จาก adrenal slices ของแฮมสเตอร์ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบ immunochemical reaction ซึ่งทำได้โดยวัดปริมาณฮอร์โมนใน media จาก adrenal slices ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (Serial Dilution) เทียบกับกราฟมาตรฐาน จะได้กราฟที่เขียนระหว่าง % bound กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานขนานกับกราฟที่เขียนขึ้นระหว่าง % bound กับ dilution ของ media (รูปที่ 2)

<u>การแปลผลทางสถิติ</u>

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$) เปรียบเทียบปริมาณการหลั่งคอร์ติซอลในน้ำยาต่างกัน 4 ชนิด และระดับน้ำตาลในเลือด (Fasting Blood Sugar) ระหว่างแฮมสเตอร์กลุ่มที่ไม่เป็นเบาหวาน และที่เป็นเบาหวาน โดยใช้วิธี ANOVA (Duncan,one way analysis) ส่วนน้ำหนักแฮมสเตอร์, น้ำหนักต่อมหมวกไต, ปริมาณการหลั่งคอร์ติซอล และขนาดของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มรวมทั้งปริมาณอาหาร และน้ำดื่มใช้การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มแบบ unpaired T-test

I17377912



ปริมาณคอร์ติซอล เฟมโตโมลต่อ 100 ไมโครลิตร

รูปที่ 2 แสดง Paralellism ระหว่างสารละลายมาตรฐานคอร์ติซอลของคน (a) กับ Media จาก Adrenal slices ของแฮมสเตอร์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆกัน (Serial dilution) (b)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย