บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. การเก็บใบรางจืด

เก็บใบรางจืดจากอุทยานแห่งชาติออบขาน ต. น้ำแพร่ อ. หางดง จ. เชียงใหม่ (รูปที่ 6) โดยเลือกเฉพาะส่วนใบที่ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป นำมาล้าง และเช็ดให้สะอาด ตากในที่ร่มจนใบแห้งสนิทซึ่งใช้เวลาประมาณ 7 วัน นำใบรางจืดแห้งมาบดเป็นผงให้ละเอียด (รูปที่ 7 ก.) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารสกัดใบรางจืด

นำผงรางจืดแห้งที่ได้มาสกัดด้วยน้ำร้อนต้มเดือด โดยใช้ผงรางจืดและน้ำร้อนในอัตราส่วนเท่ากับ 1: 10 (w/v) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง กรองเฉพาะส่วนน้ำด้วยผ้ากอซ 3 ชั้น และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4 นำส่วนที่กรองได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer (รูปที่ 7 ข.) และเก็บใส่ขวดสีชา ปิดฝาพัน parafilm เก็บไว้ในตู้อบความชื้นที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำไปใช้

3. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนเพื่อใช้ในการทดสอบไมโครนิวเคลียส

ประยุกต์ใช้วิธีของ Fenech (2000) และ Scarpato (1998)

- คัดเลือกอาสาสมัครเพศชาย และหญิง อายุ 20-25 ปี เพศละ 5 ราย ที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงไม่เป็นโรคเรื้อรัง ไม่ได้รับยารักษาโรคเป็นประจำ ไม่เคยได้รับการฉายรังสี ไม่ติดเชื้อไวรัส และไม่เป็นโรคที่มีความผิดปกติของโครโมโซม
- เจาะเลือดจากอาสาสมัครคนละ 10 มิลลิลิตร บริเวณหลอดเลือดดำที่ข้อพับของแขนด้านใดด้านหนึ่ง โดยมี heparin เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเคลือบที่กระบอกฉีดยา เก็บเลือดที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส
- เตรียมสารละลายเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย RPMI 1640 ซึ่งมี fetal calf serum 20% และมี streptomycin และ penicillin เป็น antibiotics
- เติมเลือดที่ได้จากอาสาสมัครลงในหลอดเลี้ยงเซลล์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 6 เถารางจืด ณ บริเวณทางเข้าอุทยานแห่งชาติออบขาน ที่ทำการเก็บใบมาใช้ในงานวิจัย

รูปที่ 7 ก. ใบรางจืดแห้งที่ถูกบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า; รูปที่ 7 ข. ผงสกัดใบรางจืดที่ได้จากเครื่อง lyophilizer หลังจากสกัดด้วยน้ำร้อนอัตราส่วน 1: 10 (W: V) ได้เปอร์เซ็นต์ yeild เท่ากับ 10 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลเข้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เติม phytohaemagglutinin ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ลิมโฟไซต์แบ่งตัว
- เขย่าหลอดเลี้ยงเซลล์ให้เลือดและสารละลายต่าง ๆ เข้ากันดี ปิดจุกให้แน่นนำไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24, 36 และ/หรือ 48 ชั่วโมง จึงนำมาเติมสารต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบต่อไป

4. การทดสอบผลการเหนี่ยวนำไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน

4.1. เหนี่ยวนำด้วย mitomycin C

- เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 48 ชั่วโมง เติม mitomycin C ความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 หรือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำเป็นตัวทำละลาย เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียส การทดสอบนี้เป็น positive control
- หลังจากนั้นเขย่าหลอดเลี้ยงเซลล์ให้เลือด และสารละลายต่าง ๆ เข้ากันดี ปิดจุกให้แน่น นำไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสต่ออีก 20 ชั่วโมง
- เติม cytochalasin B ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดเลี้ยงเซลล์เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ เสร็จแล้วปิดจุกให้แน่น นำไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสต่ออีก 24 ชั่วโมง รวมระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ 92 ชั่วโมง
- นำเซลล์ที่ได้มาปั่น และเติม phosphate buffer saline (PBS) ประมาณ 4-5 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเติม 0.075M KCl 4-5 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นนำไปปั่น และดูดส่วนใสข้างบนทิ้งไป
- เติม 95% ethanol: acetic acid (3:1) ประมาณ 4-5 มิลลิลิตร (ก่อนใช้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) เพื่อเป็น fixative จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนใสข้างบนทิ้งไป (ทำซ้ำ อีก 2 ครั้ง) ผสมเซลล์ที่ก้นหลอดให้เข้ากัน
- นำเซลล์ที่ได้เตรียมบนสไลด์ และนำไปย้อมด้วยสี Giemsa 10% นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง
- วิเคราะห์หาไมโครนิวเคลียส โดยใช้กล้องจุลทรรศ์กำลังขยาย 1,000 เท่า จะเห็นนิวเคลียสเป็นสีม่วงแดงเข้ม ไซโตพลาสซึมสีม่วงอ่อนจาง ๆ
- ในแต่ละหลอดของการทดลองจะคำนวณหาค่า nuclear division index (NDI) เพื่อดูการแบ่งตัวของเซลล์ และใช้บอกความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ (cytotoxicity) (Fenech, 2000) ได้โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังสมการข้างล่างนี้

$$NDI = (Ap + Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4) / N)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อ M1 - M4 คือ จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่มีนิวเคลียส 1-4 นิวเคลียส

AP คือ จำนวน apoptotic cell

(ลักษณะของ apoptotic cell; ดูความหนาแน่นของโครมาตินภายในนิวเคลียส นิวเคลียสจะแตกและไซโตพลาสซึมติดสีเข้ม)

Nec คือ จำนวน necrotic cell

(ลักษณะของ necrotic cell; มีช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ หรือเกิดการสูญเสียไซโตพลาสซึมของเซลล์ไป)

N คือ จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งหมด (500 เซลล์)

- หลังจากนั้นทำการนับจำนวน binucleated cell จำนวน 1,000 เซลล์ เพื่อหาจำนวนไมโครนิวเคลียส ซึ่งพบว่ามีลักษณะกลม ขอบเขตชัดเจน และเรียบติดสีเช่นเดียวกับนิวเคลียสใหญ่ แต่มีขนาดเล็กกว่า ถ้าพบว่าสารที่ทดสอบมีผลทำให้จำนวนไมโครนิวเคลียสเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสารนั้นเป็น human mutagen (Fenech, 2000)

4.2. เหนี่ยวนำด้วยเมโธมิล

ใช้สารละลายเมโธมิลในน้ำความเข้มข้น 0.04, 0.17, 0.35, 0.70, 1.40, 2.80 และ 5.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ครบ 48 ชั่วโมง แล้วทำการเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับที่ทำในข้อ 4.1 โดยมีน้ำเป็น negative control เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของเมโธมิลสำหรับการทดสอบต่อไป

4.3. เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดใบรางจืด

ใช้สารสกัดใบรางจืดด้วยน้ำความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง แล้วทำการเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับที่ทำในข้อ 4.1 เพื่อทดสอบว่ารางจืดมีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสด้วยหรือไม่ โดยมีน้ำเป็น negative control และเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของสารสกัดใบรางจืดสำหรับการทดสอบต่อไป

5. การทดสอบผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโธมิลในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (*in vitro* experiments)

จากผลการทดลองตามขั้นตอนข้อที่ 4 พบว่า MMC ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้จำนวนมากพอสำหรับการศึกษาการเกิดไม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โครนิวเคลียสเท่ากับ 3.4 % และพบว่าเมโธมิลที่ความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้ maximum response ใน dose-response curve คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้สูงสุดเท่ากับ 3.2 % ส่วนสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร ไม่ทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว

ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนนี้จึงเลือกใช้เมโธมิลความเข้มข้น 1.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดใบรางจืดด้วยน้ำความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร มาทดสอบผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโธมิล โดยเตรียมหลอดทดลองต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 สรุปแผนการทดลองในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ และการเติมสารต่าง ๆ โดยให้เซลล์ได้รับสารสกัดใบรางจืด<u>ก่อน</u>การเติมเมโธมิลเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง (pre-treatment)

หลอดทดลองที่	ให้สารทดสอบที่เวลา		
	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.
1	-	-	H_2O
2	-	-	MMC 0.25 µg/ml
3	-	-	Methomyl 1.40 ng/ml
4	RJ 0.5 µg/ml	-	-
5	RJ 1.0 µg/ml	-	-
6	RJ 0.5 µg/ml	RJ 0.5 µg/ml	-
7	RJ 1.0 µg/ml	RJ 1.0 µg/ml	-
8	RJ 0.5 µg/ml	-	Methomyl 1.40 ng/ml
9	RJ 1.0 µg/ml	-	Methomyl 1.40 ng/ml
10	RJ 0.5 µg/ml	RJ 0.5 µg/ml	Methomyl 1.40 ng/ml
11	RJ 1.0 µg/ml	RJ 1.0 µg/ml	Methomyl 1.40 ng/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

H_2O = น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออนเป็น negative control

MMC = mitomycin C เป็น positive control

RJ = สารสกัดใบรางจืด

โดยที่; หลอดที่ 1 เปรียบเทียบกับหลอดที่ 2 และ 3 เป็นการดูค่าการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของ MMC และ methomyl เทียบกับ negative control

หลอดที่ 1 เปรียบเทียบกับหลอดที่ 4 และ 5 เป็นการดูค่าการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของสารสกัดใบรางจืดแบบ single doses เทียบกับ negative control

หลอดที่ 1 เปรียบเทียบกับหลอดที่ 6 และ 7 เป็นการดูค่าการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของสารสกัดใบรางจืดแบบ double doses เทียบกับ negative control

หลอดที่ 3 เปรียบเทียบกับหลอดที่ 8-11 เป็นการดูผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโธมิลทั้งแบบ single doses และ double doses ก่อนเซลล์จะได้รับเมโธมิล

ตารางที่ 2 สรุปแผนการทดลองในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ และการเติมสารต่าง ๆ โดยเติมสารสกัดใบรางจืดหลังจากเซลล์ได้รับเมโธมิลแล้วเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง (post-treatment)

หลอดทดลองที่	ให้สารทดสอบที่เวลา		
	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.
1	H_2O	-	-
2	MMC 0.25 µg/ml	-	-
3	Methomyl 1.40 ng/ml	-	-
4	-	-	RJ 0.5 µg/ml
5	-	-	RJ 1.0 µg/ml
6	-	RJ 0.5 µg/ml	RJ 0.5 µg/ml
7	-	RJ 1.0 µg/ml	RJ 1.0 µg/ml
8	Methomyl 1.40 ng/ml	-	RJ 0.5 µg/ml
9	Methomyl 1.40 ng/ml	-	RJ 1.0 µg/ml
10	Methomyl 1.40 ng/ml	RJ 0.5 µg/ml	RJ 0.5 µg/ml
11	Methomyl 1.40 ng/ml	RJ 1.0 µg/ml	RJ 1.0 µg/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

H_2O = น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออนเป็น negative control

MMC = mitomycin C เป็น positive control

RJ = สารสกัดใบรางจืด

โดยที่; หลอดที่ 1 เปรียบเทียบกับหลอดที่ 2 และ 3 เป็นการดูค่าการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของ MMC และ methomyl เทียบกับ negative control

หลอดที่ 1 เปรียบเทียบกับหลอดที่ 4 และ 5 เป็นการดูค่าการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของสารสกัดใบรางจืดแบบ single doses เทียบกับ negative control

หลอดที่ 1 เปรียบเทียบกับหลอดที่ 6 และ 7 เป็นการดูค่าการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของสารสกัดใบรางจืดแบบ double doses เทียบกับ negative control

หลอดที่ 3 เปรียบเทียบกับหลอดที่ 8-11 เป็นการดูผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโธมิลทั้งแบบ single doses และ double doses หลังเซลล์ได้รับเมโธมิลแล้ว

6. ทดสอบผลการเหนี่ยวนำไมโครนิวเคลียสในเซลล์ไขกระดูกหนูขาว (*in vivo* experiments)

ประยุกต์ใช้วิธีของ Alves (2002) และ กนกกาญจน์ (2536)

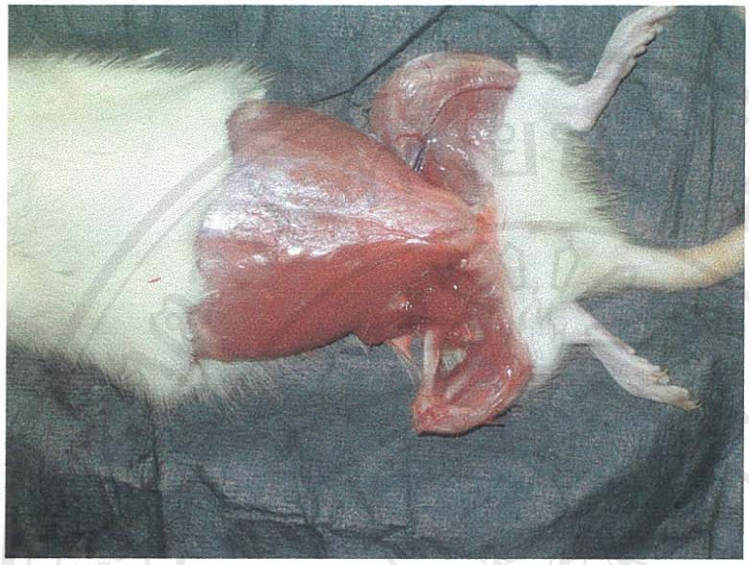
6.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley ทั้งเพศผู้ และเมีย อายุ 7 สัปดาห์ โดยสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล ก่อนการทดลองได้นำหนูขาวเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ที่หน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อให้ปรับตัวคุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมเป็นเวลา 3 วัน มีการควบคุมอุณหภูมิตลอดเวลาที่ 22 ± 3 องศาเซลเซียส เปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง มีผู้ดูแลคอยเปลี่ยนถาดรองปัสสาวะและอุจจาระวันเว้นวัน ได้รับอาหารเม็ดมาตรฐาน (ซี. พี. 082 บริษัท เอส. ดับบลิว. ที. จำกัด) และน้ำตามต้องการ

6.2 การเก็บเซลล์ไขกระดูก

- หลังจากให้สารที่ต้องการทดสอบแก่หนูขาวครั้งสุดท้าย 30 ชั่วโมง ทำการฆ่าหนูขาวโดยวิธีดมอีเทอร์ และดึงคอ ค่อย ๆ เลาะเอากระดูกต้นขาทั้ง 2 ข้างออกมา (รูปที่ 8) ตัดปลายทั้ง 2 ข้างของกระดูก แล้วใช้ fetal calf serum ในกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ชะล้างไขกระดูกลงมาในหลอดทดลอง (รูปที่ 9) ปั่นเซลล์ไขกระดูกที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 8 กระดูกต้นขาของหนูขาวที่ใช้เอาเซลล์ไขกระดูกมาศึกษาจำนวนไมโครนิวเคลียสหลังจากให้สารทดสอบกับหนูขาวตามเวลาที่ทำการทดลอง

รูปที่ 9 การชะล้างไขกระดูกจากกระดูกต้นขาของหนูขาวด้วย fetal calf serum ที่ผ่านกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นำเซลล์ไขกระดูกที่ได้สเมียร์บนสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วย้อมด้วย Leishman's stain โดยทำการ fixed สไลด์ใน dye solution นาน 10 นาทีหลังจากนั้นยกมาแช่ในส่วนผสมของ dye solution และ buffered water ในอัตราส่วน 1: 10 นาน 3 นาที แกว่งสไลด์ใน buffered water นาน 30 วินาที ผึ่งไว้ให้แห้ง
- ตรวจวิเคราะห์การเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า นับ polychromatic erythrocytes (PCEs) จำนวน 1,000 เซลล์ในไขกระดูกหนูขาวแต่ละตัว โดยดูว่า PCEs จำนวน 1,000 เซลล์มีไมโครนิวเคลียสอยู่เท่าไร
- ในขณะที่นับ PCEs นับ NCEs (normochromatic erythrocytes) จำนวน 1,000 เซลล์ด้วย เพื่อดูว่ามีจำนวน PCE เท่าไรต่อ NCEs 1,000 เซลล์ นำค่าที่ได้มาประกอบการวิเคราะห์ภาวะการกดเซลล์ไขกระดูกของสาร ถ้าสารที่ใช้ในการทดสอบไปกดการแบ่งตัวของเซลล์ไขกระดูกจะทำให้มีการสร้าง PCEs ออกมาน้อยและอาจมีรูปร่างผิดปกติ โดยดูจากค่า PCEs/PCEs+NCEs ถ้าสารที่ทดสอบนั้นไม่มีพิษต่อเซลล์ไขกระดูกอัตราส่วน PCEs/PCEs+NCEs จะต้องไม่น้อยกว่า 20% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (EPA, 1998)

6.3 เหนี่ยวนำด้วย cyclophosphamide

ใช้สารละลาย cyclophosphamide (CP) ในน้ำความเข้มข้นที่ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าทางช่องท้อง หลังจากนั้น 30 ชั่วโมงทำการฆ่าหนูขาวเพื่อเก็บเซลล์ไขกระดูก (ดังวิธีทำในขั้นตอนการเก็บเซลล์ไขกระดูก) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียส การทดสอบนี้เป็น positive control โดยมีหนูที่ได้รับน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวเป็น negative control

6.4 เหนี่ยวนำด้วยเมโธมิล

ใช้สารละลายเมโธมิลในน้ำความเข้มข้นที่ทำให้หนูขาวตายร้อยละ 5 (LD_5) หรือเท่ากับ 1-2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม (EHC, 1998) ฉีดเข้าทางช่องท้อง หลังจากนั้น 30 ชั่วโมงทำการฆ่าหนูขาวเพื่อเก็บเซลล์ไขกระดูก (ดังวิธีทำในขั้นตอนการเก็บเซลล์ไขกระดูก) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของเมโธมิลในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ไขกระดูกหนูขาว

6.5 เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดใบรางจืด

คำนวณขนาดของน้ำสกัดที่จะให้ในหนูขาวจากขนาดที่ผู้บริโภคดื่มชารางจืดจริง ๆ ในหนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัน โดยใช้ผงรางจืดแห้งหนักประมาณ 1 กรัมต่อหนึ่งซอง คือประมาณ 3 กรัมต่อน้ำหนักตัว 60 กิโลกรัม (Woodward, 1996) ต่อวัน หรือ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ผงสกัดใบรางจืด (lyophilized) ที่ได้เมื่อสกัดจากผงรางจืดแห้งมี yield ประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักผงรางจืดแห้งเริ่มต้น ดังนั้นผงรางจืดแห้ง 50 มิลลิกรัมเมื่อนำมาสกัดแล้วจะได้ yield เท่ากับ 5 มิลลิกรัม ใช้ค่าความไม่แน่นอนที่อาจเกิดขึ้น (uncertainty factor) ในการกำหนดค่าความปลอดภัย (safety factor) (Loomis, 1978) จากความแตกต่างระหว่างคนกับสัตว์ (interspecies differences) คือ 10 และความแตกต่างระหว่าง species เดียวกัน (interindividual differences) อีก 10 และเพิ่มความปลอดภัยมากยิ่งขึ้นอีก 10 มาคำนวณขนาดของน้ำสกัดใบรางจืดที่ให้กับหนูขาวคือ 5x10x10x10 เท่ากับ 50,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม แต่เนื่องจากขนาดของน้ำสกัดใบรางจืดที่คำนวณได้มีความเข้มข้นมากเกินไปที่จะป้อนให้หนูขาวได้ 1 ครั้งต่อวัน จึงแบ่งให้เป็น 2 ครั้งต่อวัน ดังนั้นขนาดที่ให้ต่อวันคือ 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม เพื่อทดสอบว่ารางจืดมีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ไขกระดูกหรือไม่

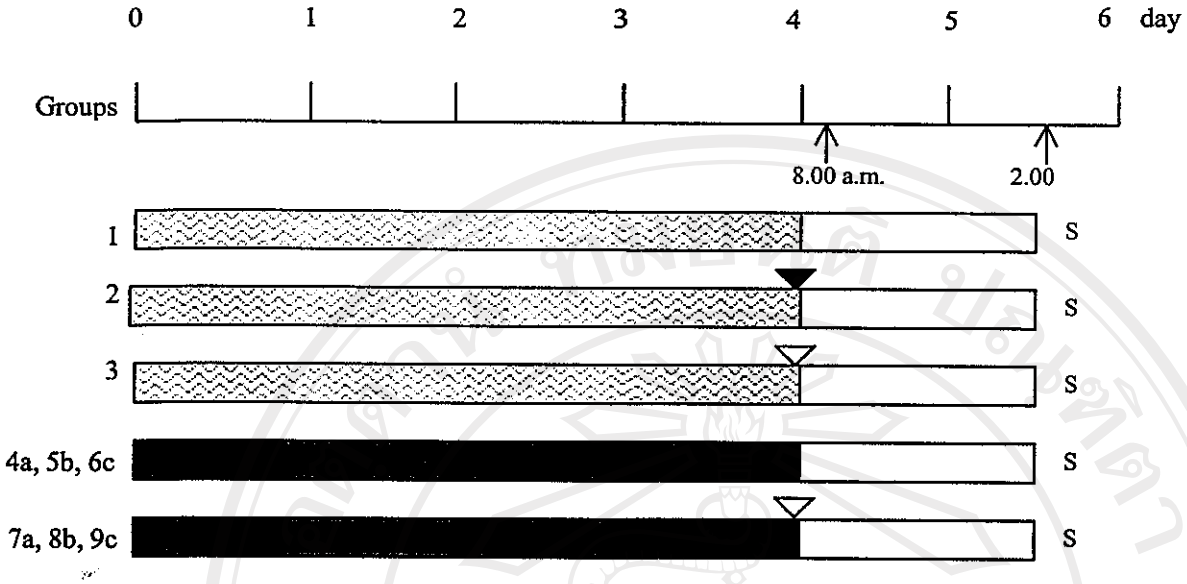
7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสของเมทโธมิลโดยวิธี micronucleus assay ในสัตว์ทดลอง (*in vivo* experiments)

จากผลการทดลองตามขั้นตอนข้อที่ 6 พบว่า CP ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้จำนวนมากพอสำหรับการศึกษาการเกิดไมโครนิวเคลียสเท่ากับ 4.23% ในหนูขาวเพศผู้ และ 4.46% ในหนูขาวเพศเมีย และเมทโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้เท่ากับ 2.43% ในหนูขาวเพศผู้ และ 1.80% ในหนูขาวเพศเมีย ซึ่งมีค่าเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว คือ 0.40% ในหนูขาวเพศผู้ และ 0.66% ในหนูขาวเพศเมีย ส่วนสารสกัดใบรางจืดด้วยน้ำความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม ไม่ทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มมากขึ้นเมื่อเมื่อเทียบกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว

ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนนี้จึงใช้เมโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม และสารสกัดใบรางจืดด้วยน้ำความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม มาทดสอบผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโธมิลดังนี้

แบ่งหนูขาวทดลองออกเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศผู้และเมียเพศละ 5 ตัว) โดยหนูขาวแต่ละกลุ่มได้รับสารต่าง ๆ ดังไดอะแกรมข้างล่างนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



▼ CP 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง

▽ เมโธมิล 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง

น้ำ ให้ทางปาก

สารสกัดใบรางจืด ให้ทางปาก

a , b , c = สารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้น 25, 250, 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ

S = ฆ่าหนูขาว

n = 5 ตัว/เพศ/กลุ่ม

กลุ่ม 1 ให้น้ำกลั่นทางปากวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น (เวลา 8.00 น. และ 18.00 น.) ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน และวันที่ 4 ตอนเช้า (เวลา 8.00 น.)

กลุ่ม 2 ให้น้ำกลั่นทางปากวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น (เวลา 8.00 น. และ 18.00 น.) ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน และวันที่ 4 ฉีด CP ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัมเข้าทางช่องท้อง

กลุ่ม 3 ให้น้ำกลั่นทางปากวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น (เวลา 8.00 น. และ 18.00 น.) ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน และวันที่ 4 ฉีดเมโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัมเข้าทางช่องท้อง

กลุ่ม 4-6 ให้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัมตามลำดับ ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น (เวลา 8.00 น. และ 18.00 น.) ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน และวันที่ 4 ตอนเช้า (เวลา 8.00 น.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่ม 7-9 ให้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัมตามลำดับ ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น (เวลา 8.00 น. และ 18.00 น.) ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน และวันที่ 4 ฉีดเมโธมิลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัมเข้าทางช่องท้อง

หลังจากให้สารต่าง ๆ ครั้งสุดท้าย 30 ชั่วโมง ทำการฆ่าหนูขาวทุกกลุ่ม เพื่อเก็บเซลล์ไขกระดูก (ดังวิธีทำในขั้นตอนการเก็บเซลล์ไขกระดูก) และทำการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ไมโครนิวเคลียสของเซลล์ไขกระดูกต่อ PCE จำนวน 1,000 เซลล์

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดไมโครนิวเคลียส ระหว่างหลอดทดสอบกับหลอดควบคุม และ เปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดไมโครนิวเคลียส ระหว่างหลอดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเมโธมิล และสารสกัดใบรางจืดกับเมโธมิล โดยใช้ paired samples t-test

เปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดไมโครนิวเคลียส ระหว่างหนูขาวกลุ่มทดสอบกับหนูขาวกลุ่มควบคุม และ เปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดไมโครนิวเคลียส ระหว่างหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเมโธมิล และสารสกัดใบรางจืดกับเมโธมิล โดยใช้ independent samples t-test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved