

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดลองใน *in vitro*

4.1.1 Dose-effect relationship ของ GLU ที่มีต่อ DNA ของจอประสาทตาไก่

หลังจาก incubate eye cup preparations ใน choline-Kreb's solution ที่มี GLU เข้มข้น 0.1, 1, หรือ 10 mM เป็นเวลา 30 นาที พบว่า เกิดการสลายของ DNA ในจอประสาทตาไก่ โดยเริ่มสังเกตเห็น smear band ของ DNA จาก eye cup ที่ incubate ใน GLU เข้มข้น 0.1 mM ลักษณะที่แสดงถึงการสลายของ DNA จะชัดเจนมากขึ้นใน eye cup ที่ incubate ใน GLU เข้มข้น 1 หรือ 10 mM การสลายของ DNA ในจอประสาทตาจะมากขึ้นตามลำดับโดยมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ GLU ดังแสดงในรูปที่ 4.1

4.1.2 ผลของ Na^+ ที่มีต่อ GLU-induced DNA damage

หลังจาก incubate eye cup preparations ใน choline-Kreb's solution ที่มี GLU เข้มข้น 1 mM เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับ eye cup preparations ที่ incubate ใน sodium-Kreb's solution ที่มี GLU เข้มข้น 1 mM เป็นเวลา 30 นาที พบว่า การสลายของ DNA ในจอประสาทตาไก่ (สังเกตจาก smear band ของ DNA) จาก eye cup ที่ incubate ใน choline-Kreb's solution หรือ sodium-Kreb's solution ไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.2

4.1.3 ผลของ Recovery ของ GLU-induced DNA damage

หลังจาก incubate eye cup preparations ใน choline-Kreb's solution ที่มี GLU เข้มข้น 0.1, 1 และ 10 mM เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการเปลี่ยน medium เป็น

choline-Kreb's solution ที่ไม่มี GLU และตรวจสอบ DNA pattern ในจอประสาทตาไก่ ที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที หลังจากเปลี่ยน medium พบว่า การสลายของ DNA ในจอประสาทตาไก่ในรูปแบบของ smear band จะเห็นได้ตั้งแต่ 0 นาทีแรกหลังเปลี่ยน medium และ smear band จะปรากฏชัดเจนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทีแรกหลังเปลี่ยน medium จากการตรวจสอบถึงเวลา 120 นาทีหลังเปลี่ยน medium ก็ยังคงพบ smear band เช่นเดิม ไม่พบแนวโน้มที่ DNA จะกลับคืนสู่สภาพปกติ ดังแสดงในรูป 4.3 a, 4.3 b, 4.3 c และ 4.3 d

4.1.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลของ EAAs (GLU, KA และ NMDA) ที่มีต่อ DNA ในจอประสาทตาไก่

หลังจาก incubate eye cup preparations ใน choline-Kreb's solution ที่มี GLU ความเข้มข้น 0.1 และ 1 mM เปรียบเทียบกับ KA ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 mM และ NMDA ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 mM เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ในความเข้มข้นที่เท่ากันคือ 0.1 mM การเกิด smear band ของ DNA จะพบได้ชัดเจนจาก GLU และ KA ในขณะที่ 1 mM ของ GLU ทำให้เกิดการสลายของ DNA เห็นได้ชัดเจนมากกว่าที่ 0.1 mM ของ KA หรือ NMDA ส่วน NMDA ไม่ว่าจะเป็นที่ความเข้มข้น 0.01 หรือ 0.1 mM ไม่พบการสลายของ DNA ปรากฏให้เห็น ดังแสดงในรูปที่ 4.4

4.1.5 ผลของ folic acid ที่มีต่อ GLU-induced DNA damage

การ incubate eye cup preparations ใน choline-Kreb's solution ที่มี folic acid เข้มข้น 10 mM ไม่พบการสลายของ DNA โดย DNA pattern มีลักษณะคล้ายกลุ่มควมคุม ส่วน GLU เข้มข้น 1 mM จะก่อให้เกิด smear band ของ DNA อย่างชัดเจน ในขณะที่ DNA ของจอประสาทตาไก่ที่ incubate ใน medium ที่มี folic acid 10 mM และ GLU 1 mM มีลักษณะ smear band แสดงว่า ยังคงมีการทำลายของ DNA เช่นเดียวกับกลุ่มที่ incubate ใน GLU อย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 4.5

4.1.6 ผลของ ZnSO_4 ที่มีต่อ GLU -induced DNA damage

ZnSO_4 ความเข้มข้น 0.1 mM ไม่มีผลต่อ DNA ดังพบว่า DNA pattern มีลักษณะเหมือนกลุ่มควบคุม ส่วน GLU ความเข้มข้น 1 mM ก่อให้เกิดการทำลาย DNA ในลักษณะ smear band อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามหลังจาก incubate eye cup preparations ใน choline-Kreb's solution ที่มี ZnSO_4 ความเข้มข้น 0.1 mM และมี GLU ความเข้มข้น 1 mM อยู่ร่วมด้วย เป็นเวลา 30 นาที พบว่า DNA ของจอประสาทตาไก่ จะมีลักษณะเหมือนกลุ่มควบคุม คือ ไม่มีการสลายของ DNA ให้เห็น เมื่อเปรียบเทียบกับ การสลายของ DNA ที่ได้รับ GLU อย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 4.6

4.1.7 ผลของ H_2O_2 ต่อ DNA ของจอประสาทตาไก่ และผลของ Na^+ ที่มีต่อ H_2O_2 - induced DNA damage

เมื่อตรวจสอบ DNA จาก eye cup preparation ที่ incubate ด้วย 3 mM H_2O_2 ใน choline-Kreb's หรือ 3 mM ใน sodium-Kreb's solution เป็นเวลา 30 นาที พบว่า เกิดการสลายของ DNA ในลักษณะ smear band ที่ไม่แตกต่างกันในทั้งสอง conditions ดังแสดงในรูปที่ 4.7 อย่างไรก็ตามจากการทดลองครั้งนี้ สามารถพบลักษณะของ DNA ladder ซึ่งแสดงถึงการทำลาย DNA อย่างจำเพาะเจาะจงใน eye cup ที่ incubate ใน choline-Kreb's solution จำนวน 1 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่างที่ทำการทดลอง

4.1.8 ผลของ folic acid ที่มีต่อ H_2O_2 - induced DNA damage

DNA จาก eye cup ที่ incubate ใน 10 mM folic acid มีลักษณะคล้ายกับกลุ่มควบคุม นั่นคือไม่พบการทำลายของ DNA ในขณะที่ 3 mM H_2O_2 ก่อให้เกิดการทำลายของ DNA ในลักษณะ smear band อย่างชัดเจน จากการตรวจสอบ DNA ของจอประสาทตาไก่ ที่ incubate ใน 10 mM folic acid และ 3 mM H_2O_2 พบว่า DNA มีลักษณะเหมือนกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.8 lane ที่ 6 คือไม่พบการสลายของ DNA ดังเช่นที่พบจากการ incubate ใน H_2O_2 อย่างเดียว 10 mM folic acid

4.1.9 ผลของ ZnSO_4 ที่มีต่อ H_2O_2 - induced DNA damage

DNA จาก eye cup ที่ incubate ใน 0.1 mM ZnSO_4 ไม่พบการสลายของ DNA แต่อย่างใด โดย DNA จะมีลักษณะเหมือนกลุ่มควบคุม ส่วน eye cup ที่ incubate ใน 3 mM H_2O_2 จะพบ การสลายของ DNA อย่างชัดเจน ในลักษณะ smear band จากการตรวจสอบ DNA ของจอประสาทตาไก่ที่ incubate ใน 0.1mM ZnSO_4 และ 3mM H_2O_2 ไม่พบการทำลายของ DNA โดย DNA pattern มีลักษณะเหมือนกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.8 lane ที่ 7

4.2 ผลการทดลองใน *in vivo*

4.2.1 ผลของ GLU ต่อ DNA ในจอประสาทตาไก่

จากการฉีด GLU เข้าสู่ดวงตา ในขนาด 10 $\mu\text{moles/eye}$ แล้วตรวจสอบลักษณะของ DNA ที่เวลา 30 และ 60 นาที หลังฉีด พบว่า เกิดการสลายของ DNA ในลักษณะ smear band โดยที่เมื่อเวลานานขึ้น การสลายของ DNA จะเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.9 a, lane ที่ 4 และ 4.9 b, lane ที่ 4 ขณะที่ ไม่พบการสลายของ DNA ในกลุ่มควบคุม

4.2.2 ผลของ ZnSO_4 ที่มีต่อ GLU - induced DNA damage

การฉีด ZnSO_4 ในขนาด 0.1 $\mu\text{moles/eye}$ ไม่มีผลต่อ DNA โดยพบว่า DNA pattern มีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มควบคุม ส่วน GLU ในขนาด 10 $\mu\text{moles/eye}$ ก่อให้เกิดการทำลายของ DNA ในลักษณะ smear band อย่างชัดเจน ในขณะที่ การฉีด ZnSO_4 ในขนาด 0.1 $\mu\text{moles/eye}$ ร่วมกับพบ GLU ในขนาด 10 $\mu\text{moles/eye}$ พบว่า DNA ของจอประสาทตาไก่ มีลักษณะเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม นั่นคือ ไม่พบการสลายของ DNA ทั้งที่ เวลา 30 และ 60 นาที หลังจากฉีด ดังแสดงในรูปที่ 4.9 a, lane ที่ 5 และ 4.9 b, lane ที่ 5

4.2.3 ผลของ H_2O_2 ต่อ DNA ในจอประสาทตาไก่

จากการฉีด H_2O_2 ในปริมาณ 3 $\mu\text{moles/eye}$ แล้วตรวจสอบลักษณะของ DNA ที่เวลา 30 นาทีหลังฉีด พบว่า เกิดการสลายของ DNA ในลักษณะ smear band ดังเช่นที่พบใน *in vitro* ดังแสดงในรูปที่ 4.10, lane ที่ 4 และ 4.11, lane ที่ 4 ขณะที่ไม่พบการสลายของ DNA ในกลุ่มควบคุม

4.2.4 ผลของ folic acid ที่มีต่อ H_2O_2 - induced DNA damage

การฉีด folic acid ในขนาด 10 $\mu\text{moles/eye}$ ไม่มีผลต่อ DNA ของจอประสาทตาไก่ ดังพบว่า DNA pattern มีลักษณะเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม ส่วน H_2O_2 3 $\mu\text{moles/eye}$ ก่อให้เกิดการทำลาย DNA ในลักษณะ smear band ในขณะที่การฉีด folic acid ในขนาด 10 $\mu\text{moles/eye}$ ร่วมกับ H_2O_2 3 $\mu\text{moles/eye}$ เป็นเวลา 30 นาที พบว่า เกิดการสลายของ DNA ในลักษณะ smear band ดังแสดงในรูปที่ 4.10 lane ที่ 5 ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบใน DNA ของจอประสาทตาไก่ที่ได้รับการฉีด H_2O_2 3 $\mu\text{moles/eye}$ เพียงอย่างเดียว

4.2.5 ผลของ $ZnSO_4$ ที่มีต่อ H_2O_2 - induced DNA damage

การฉีด $ZnSO_4$ ในขนาด 0.1 $\mu\text{moles/eye}$ ไม่มีผลต่อ DNA ของจอประสาทตาไก่ โดย DNA pattern มีลักษณะเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม หลังจากฉีด $ZnSO_4$ ในขนาด 0.1 $\mu\text{moles/eye}$ ร่วมกับ H_2O_2 3 $\mu\text{moles/eye}$ ที่เวลา 30 นาทีหลังฉีด ทำการตรวจสอบ DNA pattern พบว่า DNA ของจอประสาทตาไก่ มีลักษณะเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม นั่นคือ ไม่พบการสลายของ DNA ที่เวลา 30 นาทีหลังฉีด ดังแสดงในรูปที่ 4.11 lane ที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับที่ฉีด H_2O_2 ในปริมาณ 3 $\mu\text{moles/eye}$ อย่างเดียวที่พบ smear band ชัดเจน

รูปที่ 4.1 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่ หลังจาก incubate ใน choline-Kreb's solution ที่มี GLU ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ choline-Kreb's solution เป็นกลุ่มควบคุม

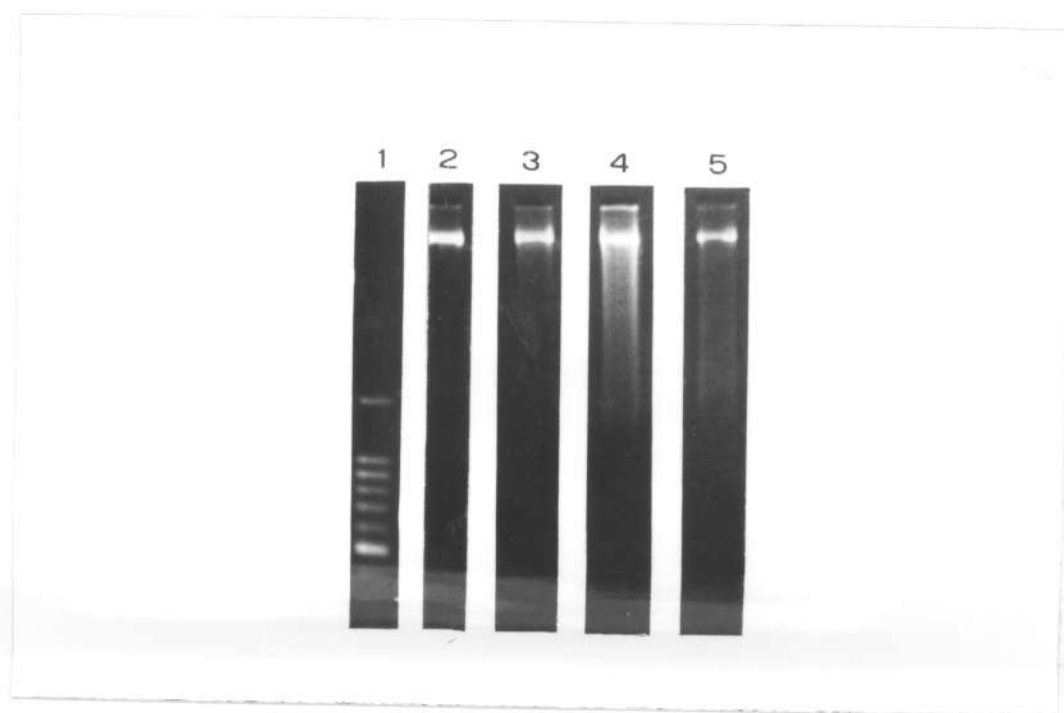
lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

lane 3 : 0.1 mM GLU

lane 4 : 1 mM GLU

lane 5 : 10 mM GLU



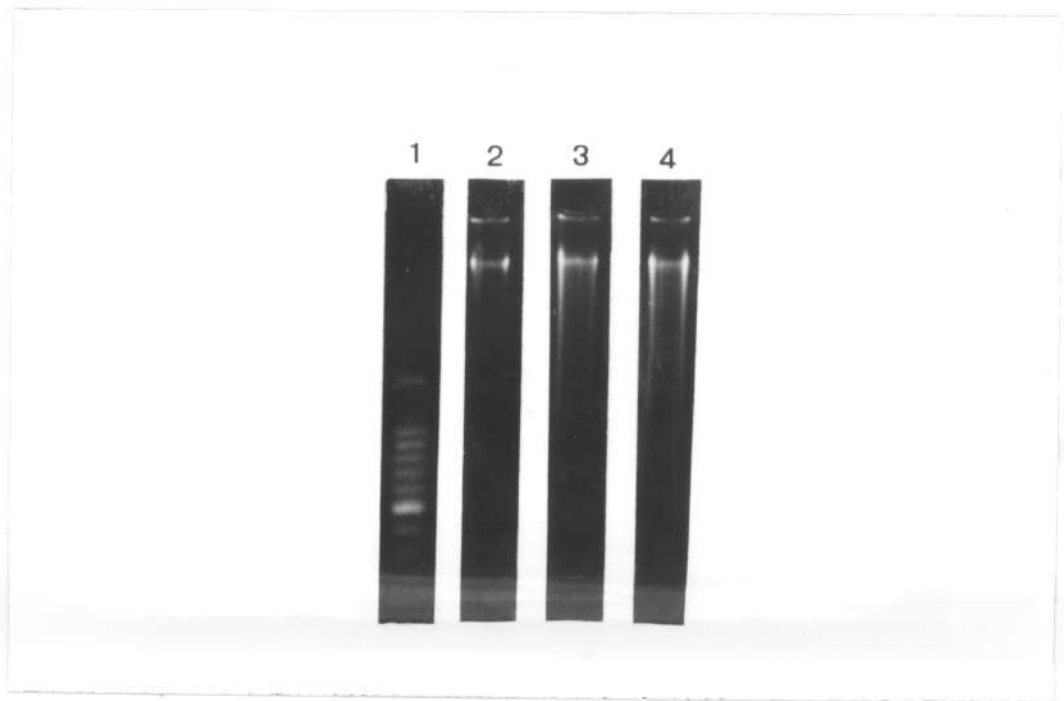
รูปที่ 4.2 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่ หลังจาก incubate ใน choline-Kreb's solution หรือ sodium-Kreb's solution ที่มี GLU ความเข้มข้น 1 mM เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ choline-Kreb's solution เป็นกลุ่มควบคุม

lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

lane 3 : 1 mM GLU ใน choline-Kreb's solution

lane 4 : 1 mM GLU ใน sodium-Kreb's solution



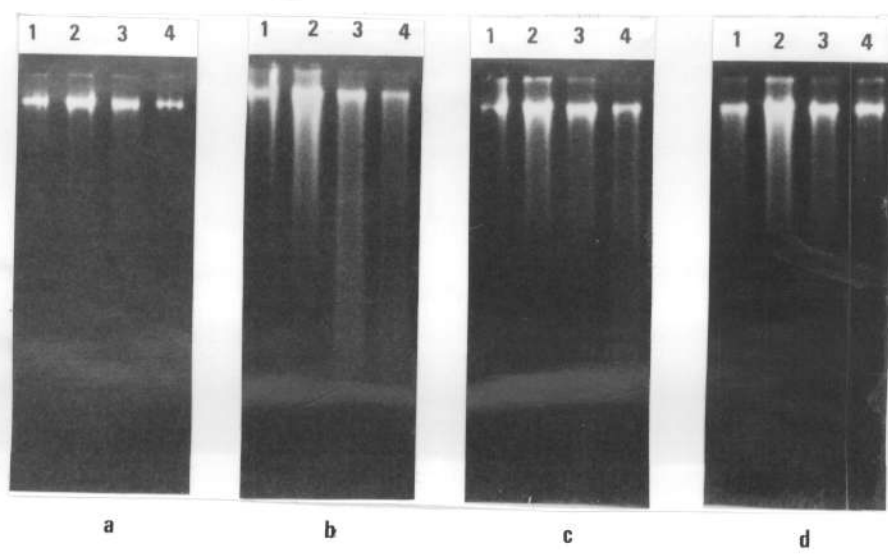
รูปที่ 4.3 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่ หลังจาก incubate ใน choline-Kreb's solution (a), 0.1 mM GLU (b), 1 mM GLU (c) หรือ 10 mM GLU (d) เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยน medium เป็น choline-Kreb's solution และตรวจสอบ DNA pattern ที่เวลาต่าง ๆ

lane 1 : หลังเปลี่ยน medium ที่เวลา 0 นาที

lane 2 : หลังเปลี่ยน medium ที่เวลา 30 นาที

lane 3 : หลังเปลี่ยน medium ที่เวลา 60 นาที

lane 4 : หลังเปลี่ยน medium ที่เวลา 120 นาที



รูปที่ 4.4 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่ หลังจาก incubate ใน choline-Kreb's solution ที่มี GLU, KA หรือ NMDA เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ choline-Kreb's solution เป็นกลุ่มควบคุม

lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

lane 3 : 0.1 mM GLU

lane 4 : 1 mM GLU

lane 5 : 0.01 mM KA

lane 6 : 0.1 mM KA

lane 7 : 0.01 mM NMDA

lane 8 : 0.1 mM NMDA

รูปที่ 4.5 แสดง DNA pattern ของจอบประสาทตาไก่ หลังจาก incubate ใน choline-Kreb's solution ที่มี folic acid, GLU หรือ folic acid ร่วมกับ GLU เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ choline-Kreb's solution เป็นกลุ่มควบคุม

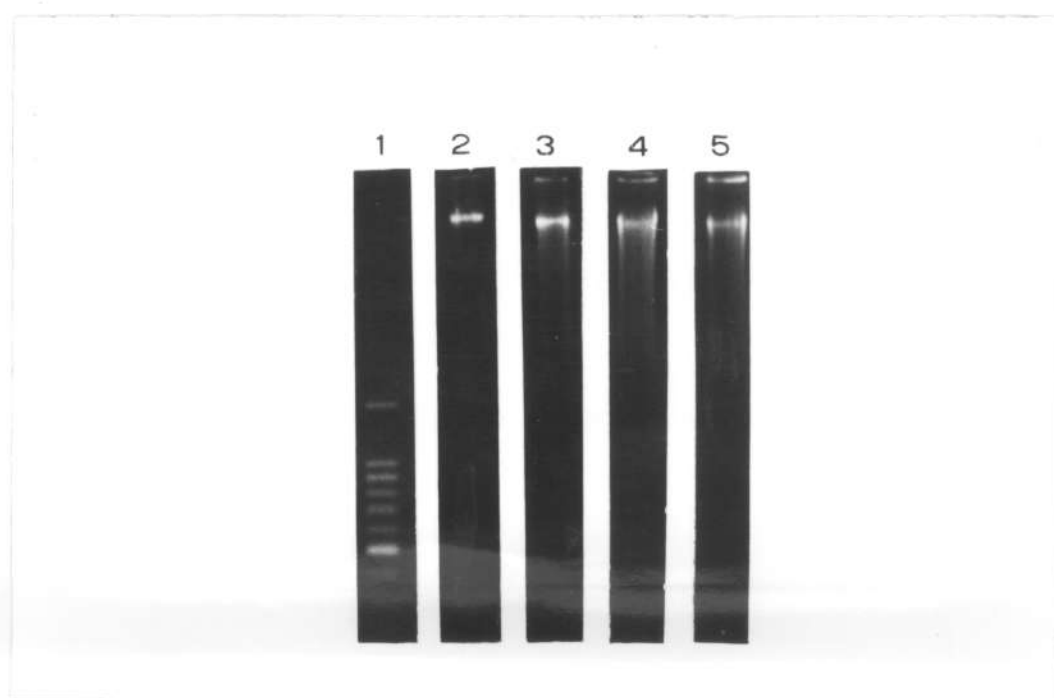
lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

lane 3 : 10 mM folic acid

lane 4 : 1 mM GLU

lane 5 : 10 mM folic acid และ 1 mM GLU



รูปที่ 4.6 แสดง DNA pattern ของจอบประสาทตาไก่ หลังจาก incubate ใน choline-Kreb's solution ที่มี ZnSO_4 , GLU หรือ ZnSO_4 ร่วมกับ GLU เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ choline-Kreb's solution เป็นกลุ่มควบคุม

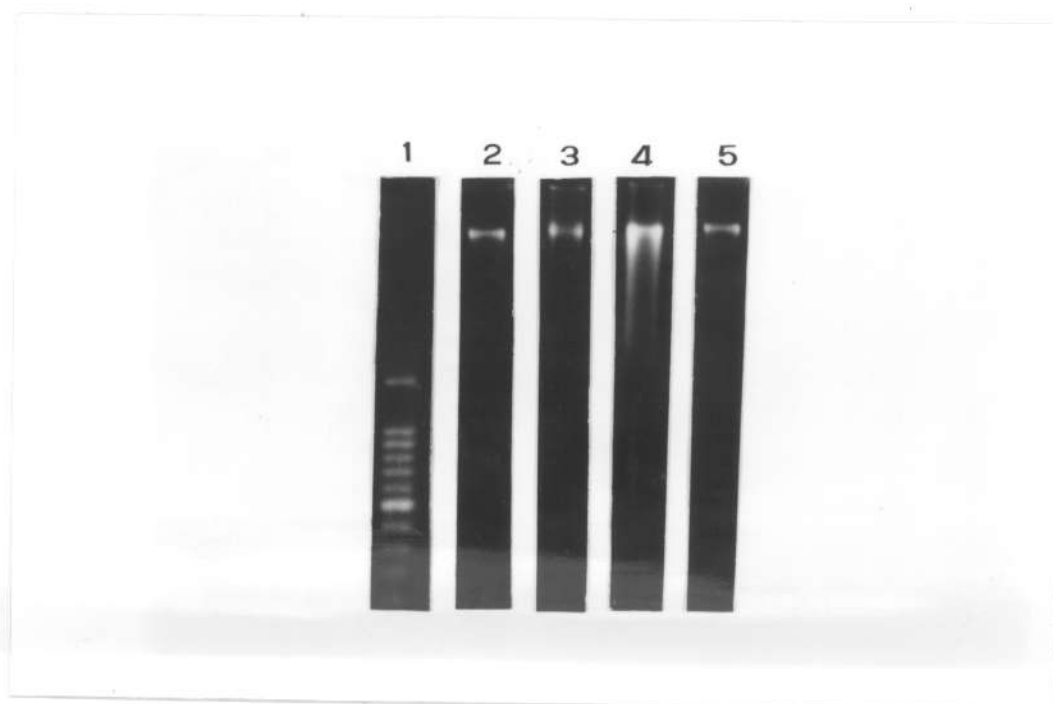
lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

lane 3 : 0.1 mM ZnSO_4

lane 4 : 1 mM GLU

lane 5 : 0.1 mM ZnSO_4 และ 1 mM GLU



รูปที่ 4.7 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่ หลังจาก incubate ใน choline-Kreb's solution หรือ sodium-Kreb's solution ที่มี H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ choline -Kreb's solution เป็นกลุ่มควบคุม

lane 1 : DNA marker

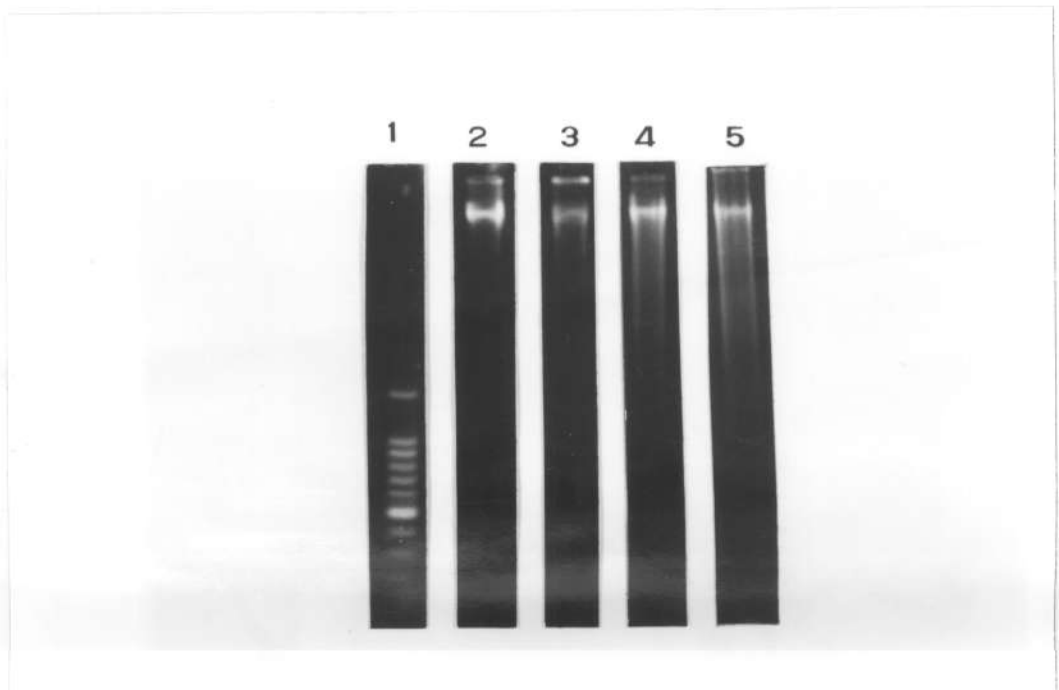
lane 2 : กลุ่มควบคุม

lane 3 : 3 mM H_2O_2 ใน choline-Kreb's solution

lane 4 : 3 mM H_2O_2 ใน choline-Kreb's solution

lane 5 : 3 mM H_2O_2 ใน sodium-Kreb's solution

หมายเหตุ : สังเกตลักษณะ DNA ladder ใน lane 3 ซึ่งพบ 1 ตัวอย่าง จาก 4 ตัวอย่างที่ทำการทดลอง



รูปที่ 4.8 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่ หลังจาก incubate ใน choline-Kreb's solution ที่มี folic acid, ZnSO_4 , H_2O_2 หรือ folic acid ร่วมกับ H_2O_2 , หรือ ZnSO_4 ร่วมกับ H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ choline-Kreb's solution เป็นกลุ่มควบคุม

lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

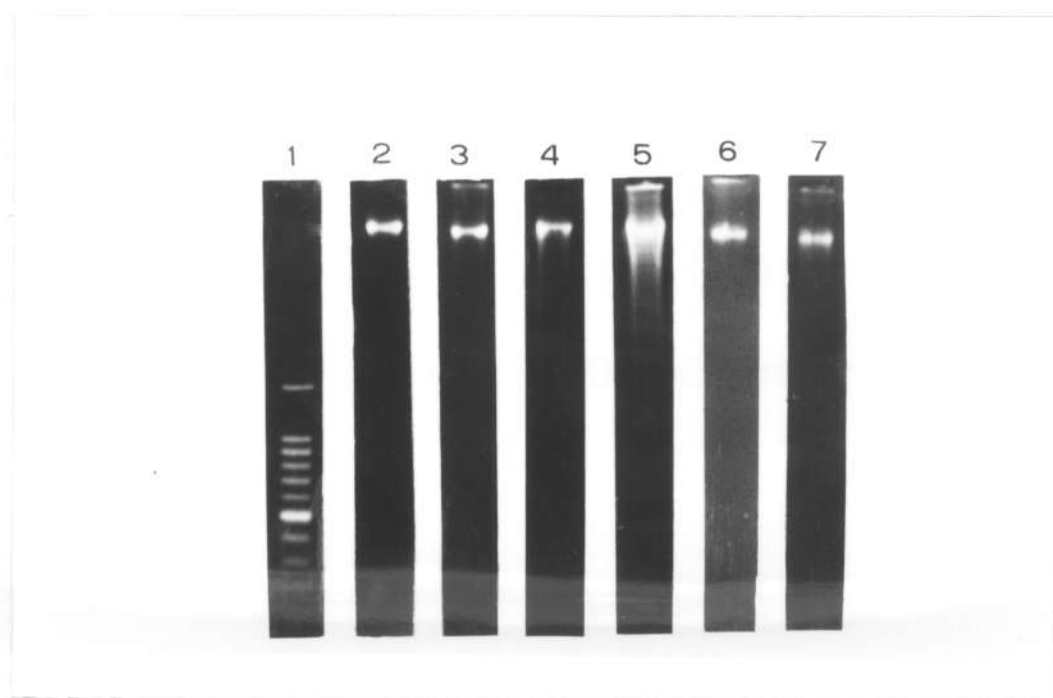
lane 3 : 0.1 mM ZnSO_4

lane 4 : 10 mM folic acid

lane 5 : 3 mM H_2O_2

lane 6 : 10 mM folic acid และ 3 mM H_2O_2

lane 7 : 0.1 mM ZnSO_4 และ 3 mM H_2O_2



รูปที่ 4.9 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่หลังได้รับการฉีดด้วย GLU, ZnSO_4 หรือ GLU และ ZnSO_4 เป็นเวลา 30 นาที (a) หรือ 60 นาที (b) โดยใช้น้ำกลั่น เป็นกลุ่มควบคุม

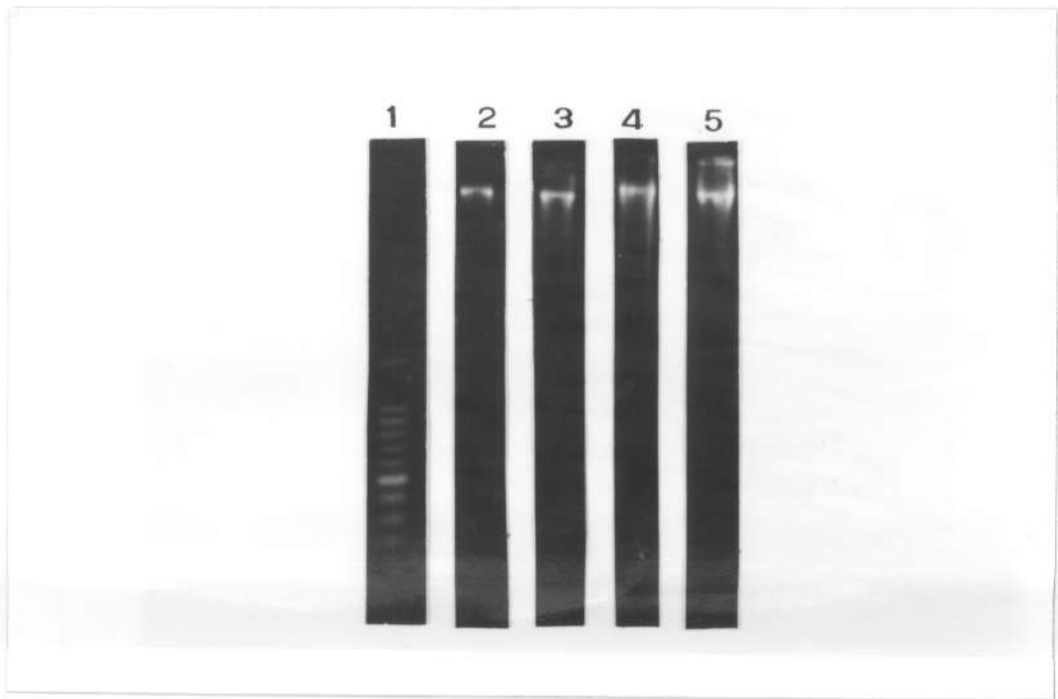
lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

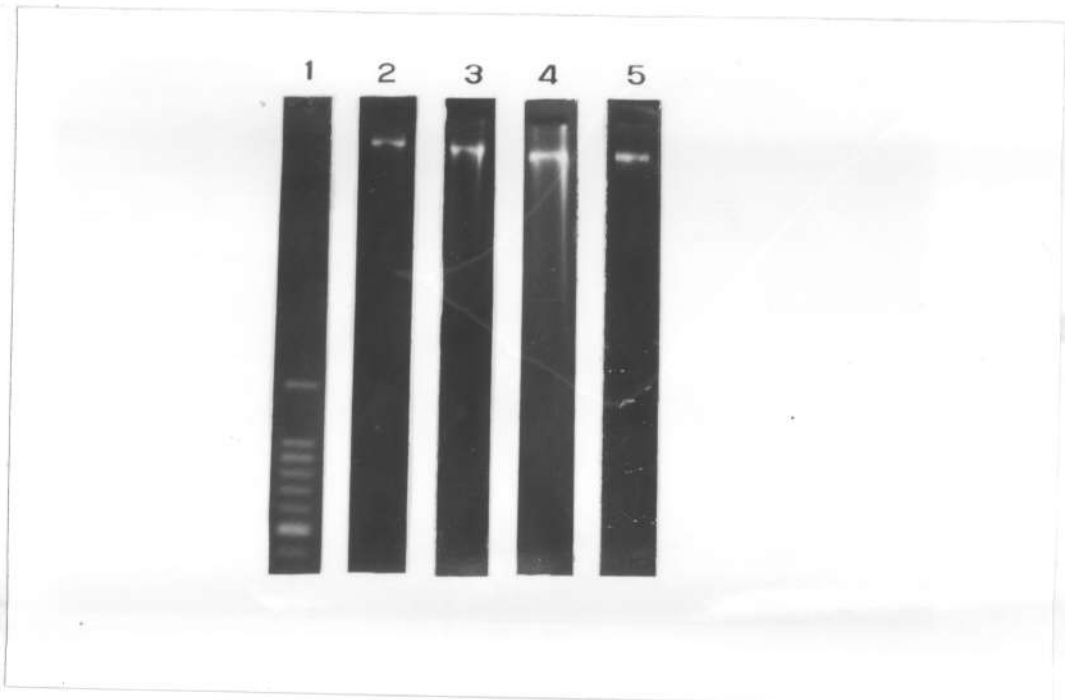
lane 3 : $0.1 \mu\text{moles/eye ZnSO}_4$

lane 4 : $10 \mu\text{moles/eye GLU}$

lane 5 : $0.1 \mu\text{moles/eye ZnSO}_4$ และ $10 \mu\text{moles/eye GLU}$



a



b

รูปที่ 4.10 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่ หลังได้รับการฉีดด้วย folic acid, H_2O_2 หรือ folic acid และ H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้น้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุม

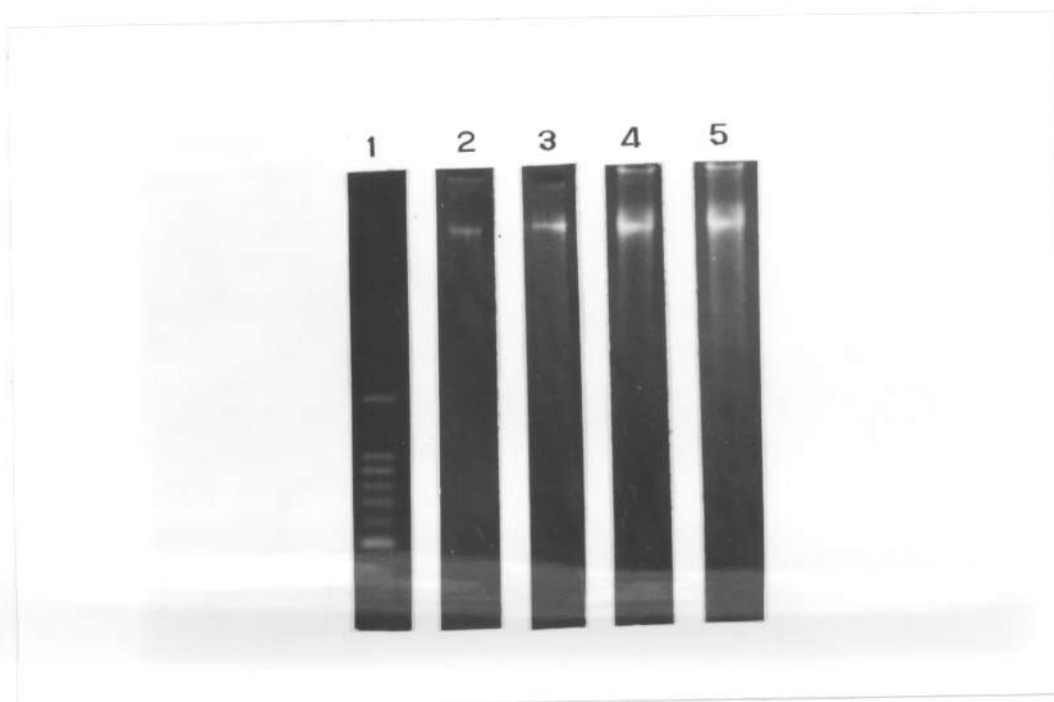
lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

lane 3 : 10 μ moles/eye folic acid

lane 4 : 3 μ moles/eye H_2O_2

lane 5 : 10 μ moles/eye folic acid และ 3 μ moles/eye H_2O_2



รูปที่ 4.11 แสดง DNA pattern ของจอประสาทตาไก่หลังได้รับการฉีดด้วย ZnSO_4 , H_2O_2 หรือ ZnSO_4 ร่วมกับ H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที

lane 1 : DNA marker

lane 2 : กลุ่มควบคุม

lane 3 : 0.1 $\mu\text{moles/eye}$ ZnSO_4

lane 4 : 3 $\mu\text{moles/eye}$ H_2O_2

lane 5 : 0.1 $\mu\text{moles/eye}$ ZnSO_4 และ 3 $\mu\text{moles/eye}$ H_2O_2

