

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ เป็นการศึกษานแบบ Experimental design โดยทำการทดลอง
ในหนูขาว พันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ น้ำหนักอยู่ระหว่าง 300-400 กรัม

สารเคมีที่ใช้

1. 1,1,1-Trichloroethane (MW 133.41) 99+ % Lot 02907 CX ผลิตโดย Aldrich Chemical Company
2. Trichloroethylene (MW 131.39) 99+ % Lot 03714 PV ผลิตโดย Aldrich Chemical Company
3. Pentobarbital sodium (Nembutal sodium^R) ของ Abbott Laboratory
4. Heparin (5000 i.u./ml) ผลิตโดย Novo Nordisk A/S, Denmark
5. Taurocholic acid (MW 537.7) Product No. T-4009 ผลิตโดย Sigma Chemical Company
6. Tris HCl (MW 157.6), Tris base (MW 121.1) ผลิตโดย Sigma Chemical Company
7. 7 α -Hydroxysteroid dehydrogenase Product No. H-9506 EC 1.1.1.159 (3.6 unit/mg solid, 5.6 unit/mg protein) ผลิตโดย Sigma Chemical Company
8. β -Nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD⁺) (MW 663.4) Product No. N-7004 Purity prepared 97% ผลิตโดย Sigma Chemical Company
9. Resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide)sodium salt (MW 251.2) Product No. R-2127 ผลิตโดย Sigma Chemical Company
10. Diaphorase Product No. D-2381 EC 1.8.1.4 (8.0 unit/mg solid, 10.5 unit/mg protein) ผลิตโดย Sigma Chemical Company

11. Trichloroacetic acid (MW 163.4) ผลิตโดย Sigma Chemical Company
12. Sulfobromophthalein sodium salt (MW 838.0) No.S-0252 ผลิตโดย Sigma Chemical Company
13. NaH_2PO_4 (MW 137.99), NaCl (MW 58.4) และสารเคมีอื่น ๆ มีความบริสุทธิ์ระดับ technical grade
14. Indocyanine green (MW 775) I-2633 ผลิตโดย Sigma Chemical Comp.
15. Bovine serum albumin (Fraction V) ผลิตโดย Sigma Chemical Comp.
16. Mazola^R refined corn oil (100% corn oil) ผลิต 0591 แบ่งบรรจุ 160591 โดยบริษัท ซีพีซี/ อายี (ประเทศไทย) จำกัด

วิธีการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

- ก. การหาค่าตรวจการทำงานตับทางชีวเคมี
- ข. การหาค่าทางเภสัชจลนศาสตร์และการขับถ่าย BSP หรือ ICG ออกทางน้ำดี
- ก. การหาค่าตรวจการทำงานตับทางชีวเคมี
 1. การหาค่าตรวจการทำงานตับทางชีวเคมี หลังจากสัตว์ทดลองได้รับสารเคมีตัวทำละลายอินทรีย์ 1,1,1-trichloroethane (TRI) หรือ trichloroethylene (TCY) ในขนาดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 วัน

แบ่งหนูขาวออกเป็น 8 กลุ่ม (กลุ่มละ 5 ตัว) โดยหนูขาวในกลุ่มควบคุมจะได้รับการฉีด corn oil (1.0 ml/kg) เข้าทางช่องท้อง ส่วนกลุ่มทดลอง จะได้รับสารเคมี ได้แก่ TRI หรือ TCY ซึ่ง ละลายใน corn oil ในขนาดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 วันละครั้ง ในตอนเช้า (8.00-9.00 น.) เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน โดยขนาดของสารเคมีแต่ละชนิดจะแบ่งออกเป็น 3 - 4 ขนาด คือ ขนาดต่ำ ($1/50 \text{ LD}_{50}$), ขนาดกลาง ($1/10 \text{ LD}_{50}$), ขนาดสูง ($1/2 \text{ LD}_{50}$) และขนาดสูงมาก (LD_{50}) โดยจะใช้ค่า LD_{50} จากการรายงานของ Lundberg และคณะ (1986) ผู้วิจัยได้ตระหนักดีว่า ค่า LD_{50} ที่นำมาใช้ เป็นเพียงค่าที่นำมาตั้งต้นเพื่อทำการศึกษาต่อไปเท่านั้น ผู้วิจัยไม่มีวัตถุประสงค์ที่จะพิสูจน์ หรือหาค่า LD_{50} ซ้ำอีก เนื่องจากค่า LD_{50} ที่ทำการศึกษาโดยมีเงื่อนไขสิ่งแวดล้อมแต่ละแบบ อาจมีค่าแตกต่างกันได้ ซึ่งการศึกษาของผู้วิจัยได้พบในเวลาต่อมาว่า แม้หนูที่ได้รับสารขนาด LD_{50} แต่มีจำนวนหนูที่ตายลงน้อยมาก

ตารางที่ 2 แสดงชนิด ขนาด และ ปริมาณ ของสารเคมีที่ฉีดให้หนูขาวทางช่องท้อง วันละครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน

กลุ่มที่	สารตัวทำละลาย อินทรีย์	ขนาดของสาร mmol/kg (g/kg)	ปริมาณที่ฉีด (ml/kg)
1	Corn oil	-	1
2	TRI	0.54 (0.072)	1
3	TRI	2.70 (0.360)	1
4	TRI	13.50 (1.800)	2
5	TCY	0.20 (0.026)	1
6	TCY	1.00 (0.128)	1
7	TCY	5.00 (0.657)	1
8	TCY	10.00 (1.314)	1

หลังจากให้สารครั้งสุดท้าย งดให้อาหารหนู แต่จะให้เฉพาะน้ำ เป็น เวลา 4 ชั่วโมง นำมาทำให้สลบโดยฉีด nembutal^R ขนาด 50 mg/kg เข้าทางช่องท้อง (i.p.) แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือด โดยวิธีดูดจากหัวใจ (heart puncture) ภายหลังจากเปิดช่องอก โดยใช้ syringe ที่เคลือบด้วย heparin (5,000 unit/ml) ตัวอย่างเลือดที่ได้ นำมาแยกพลาสมา โดยใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที โดยเครื่อง Beckman CPR Centrifuge

นำพลาสมามาวิเคราะห์หาปริมาณของ เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), total bilirubin (TBIL) และ ปริมาณ กรดน้ำดี โดยวิธีการต่อไปนี้

1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ ALT และ AST ใช้น้ำยาสำเร็จรูปของ Wako Autokit

GPT และ Wako Autokit GOT โดยใช้วิธีของ Karmen และคณะ (1955), Bergmeyer และคณะ (1970) และ Enzyme Nomenclature - Recommendation of the International Union of Biochemistry (1965)

การวิเคราะห์หาปริมาณ ALP ใช้หัตถวิธีโดยการเตรียมโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1954)

การวิเคราะห์หาปริมาณ GGT ใช้หัตถวิธีสำเร็จรูปของ Gilford Systems (LF 203E06HA)

การวิเคราะห์หาปริมาณ TBIL ใช้หัตถวิธีสำเร็จรูปของ Technicon RA-Systems (Product No.T01-1963-02)โดยวิธีของ Van den Bergh (1916), Pearlman และคณะ (1974) และ Novros และคณะ (1979)

และ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ ALT, AST, ALP, GGT และ TBIL โดยใช้เครื่อง Technicon RA-100

1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดน้ำดีปฐุมภูมิ โดยปรับปรุงจากวิธีของ Mashige และคณะ (1976), Ozuga และคณะ (1977) และ Diamandi และคณะ (1983) ดังนี้

1.2.1 ไปเบตสารละลายมาตรฐาน taurocholate (ความเข้มข้น 1-32 μM) หรือ พลาสมา ปริมาณ 50 μl ใส่ลงในหลอดทดลอง

1.2.2 เติม Tris buffer 100 mM pH 9.0 จำนวน 1.0 ml

1.2.3 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 67°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น ทำให้เย็นลง เท่ากับอุณหภูมิห้อง

1.2.4 เติม 7 α -HSD ความเข้มข้น 0.075 unit/ml จำนวน 0.1 ml, NAD⁺ ความเข้มข้น 8 mg/ml จำนวน 0.125 ml, resazurin ความเข้มข้น 80 μM จำนวน 0.125 ml และ diaphorase ความเข้มข้น 1.26 unit/ml จำนวน 0.1 ml (โดยในหลอด blank จะใส่สารทุกชนิด ยกเว้น 7 α -HSD แต่จะใส่น้ำกลั่นแทน)

1.2.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

1.2.6 เติม 20% TCA จำนวน 37.5 μl

1.2.7 นำไปวัดค่าการเรืองแสงโดยให้ Excitation อยู่ที่ความยาวคลื่น 560 nm และ Emission อยู่ที่ความยาวคลื่น 580 nm โดยเครื่อง Fluorescence Spectrophotometer Hitachi Model 650-40

1.2.8 นำค่าการเรืองแสงของหลอด blank ลบออกจาก หลอดทดสอบ แล้วนำไป

คำนวณหาปริมาณกรดน้ำดีปฐมภูมิ จาก standard curve โดยใช้ taurocholate เป็นกรดน้ำดีมาตรฐาน

2. การหาค่าตรวจการทำงานตับทางชีวเคมี หลังจากได้รับสาร TRI หรือ TCY ในขนาดต่ำ เป็นเวลา 3 และ 14 วัน

ทำการทดลองคล้ายกับการทดลองในข้อที่ 1 แบ่งหนูขาวออกเป็น 2 ชุด ชุดละ 3 กลุ่ม (กลุ่มละ 6 ตัว) โดยให้ได้รับสารเคมีในขนาดที่แสดงในตารางที่ 3

ในชุดแรก เมื่อหนูได้รับสารครบ 3 วัน ทำให้นุสลบด้วย nembutal^R แล้วทำการเก็บเลือดจากหัวใจ นำพลาสมามาวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ตับ ALT และวัดระดับกรดน้ำดีปฐมภูมิในพลาสมา ส่วนในหนูชุดที่สอง เมื่อหนูได้รับสารเคมีครบ 14 วัน ทำการเก็บเลือดจากหัวใจเช่นเดียวกัน แล้วจึงนำพลาสมามาวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ ALT, AST, ALP, GGT ตลอดจนวัดระดับ TBIL และระดับกรดน้ำดีปฐมภูมิในพลาสมา ตามขั้นตอนในรายละเอียดที่แสดงไว้ในข้อที่ 1

ตารางที่ 3 แสดง ชนิด ขนาด และปริมาณของสารตัวทำลายอินทรีย์ที่ฉีดให้แก่หนูขาวทางช่องท้อง วันละครั้ง เป็นเวลา 3 และ 14 วันติดต่อกัน

กลุ่มที่	สารตัวทำลายอินทรีย์	ขนาดของสาร mmol/kg (g/kg)	ปริมาณที่ฉีด (ml/kg)
1	corn oil	—	0.5
2	TRI	0.108 (0.014)	0.5
3	TCY	0.200 (0.026)	0.5

ข. การหาค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ และการถ่ายภาพ BSP หรือ ICG ทางน้ำดี

เลือกทำการทดลองในหนูกลุ่มที่ได้รับสารเคมีในขนาดที่คาดว่าจะ ไม่ทำให้เซลล์ตับเสียหาย โดยวิเคราะห์จากการตรวจการทำงานของตับทางชีวเคมี โดยในแต่ละกลุ่ม กำหนดจำนวนสัตว์ทดลอง กลุ่มละประมาณ 5-7 ตัว ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับเฉพาะ corn oil อย่างเดียว ขั้นตอน และ วิธีการให้สารเคมี จะทำเหมือนกับกลุ่มที่ต้องการตรวจการทำงานของตับทางชีวเคมีทุกประการ (ให้สาร 3 วัน) หลังจากให้สารครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการสลบหนูด้วย nembutal^R (50 mg/kg i.p.) เมื่อสลบแล้ว ทำการผ่าตัดเปิดหลอดลม ใส่ท่อ polyethylene (PE) เพื่อดูแลการหายใจ และทำการเปิดหลอดเลือด jugular vein และ femoral artery เพื่อสอดท่อ catheter (PE-50) เข้าไป หล่อเส้นเลือดทั้งสองด้วยสารละลาย heparinized normal saline (heparin 30 unit/ml) หลังจากนั้นทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อทำการใส่ท่อ catheter (PE-10) เข้าไปในท่อน้ำดีบริเวณที่ทอดลงมาสู่ลำไส้เล็กตอนต้น ปลอ่ยให้น้ำดีไหลตามอิสระ ประมาณ 5 นาที จึงเริ่มเก็บข้อมูลโดยทำการเก็บและวัดอัตราการไหลของน้ำดี โดยเก็บน้ำดีในหลอดพลาสติกขนาดเล็กที่มีฝาปิดและได้ขึงน้ำหนัไว้ก่อนแล้ว ทำการเก็บน้ำดีเป็นช่วงเวลา ช่วงละ 10 นาที เป็นเวลา 100 นาที และทำการวัดปริมาณของน้ำดีที่ถูกขับออกมาแต่ละช่วงเวลาโดยนำไปชั่งน้ำหนัก โดยที่คาดว่าน้ำดีมีความหนาแน่นเท่ากับ 1 g/ml (Mori et al., 1987) ส่วนการทดลองทางด้านการกล้ำเกลี้ยงสารจะทำได้ไปพร้อมกับการเก็บตัวอย่างน้ำดี การทดลองเริ่มหลังจากเก็บน้ำดีเป็นค่าพื้นฐานนาน 10 นาที โดย

1. การหาค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ และการถ่ายภาพ BSP ทางน้ำดี

ฉีด BSP 25 mg/kg (ละลายใน NSS) เข้าทาง jugular vein แล้วเก็บตัวอย่างเลือด (ประมาณ 0.2-0.3 ml) ทาง femoral artery ที่เวลา 1.5, 3, 5, 7.5, 10, 14, 18 และ 22 นาที โดยใช้ syringe กลั้วด้วย heparin (500 unit/ml) จากนั้นแยกพลาสมาโดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Beckman Microfuge E เป็นเวลา 20-30 วินาที

เมื่อเก็บตัวอย่างเลือด และ น้ำดีครบตามกำหนดแล้ว นำพลาสมา และน้ำดีมาวิเคราะห์หาปริมาณ BSP ด้วยเครื่อง UV/VIS-Spectrophotometer ดังนี้ (Henry et al., 1974)

1.1 ไปเปิดสารละลายมาตรฐาน BSP ความเข้มข้น 7-70 $\mu\text{g/ml}$ ในปริมาณ 0.1 ml หรือพลาสมาในปริมาณ 0.025-0.1 ml หรือน้ำดีที่ทำให้เจือจางลงแล้ว 10-40 เท่า ในปริมาณ 0.025-0.1 ml ใส่ลงใน cuvette

1.2 เติม 100 mM Tris buffer pH 10.5 ให้ได้ปริมาตรรวม 0.7 ml

1.3 นำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 577 nm ด้วยเครื่อง

Spectrophotometer (Jasco Model 7800)

1.4 เติม NaH_2PO_4 2 M จำนวน 40 μl นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดิม

1.5 นำผลต่างของค่าดูดกลืนแสง ระหว่างข้อ 1.3 และ 1.4 ไปคำนวณหาความเข้มข้นของ BSP โดยเทียบกับ standard curve

2. การหาค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ และการถ่ายภาพ ICG ทางน้ำดี

ฉีด ICG 5 mg/kg (ละลายใน 1.0% BSA ใน NSS) ทาง jugular vein แล้วเก็บตัวอย่างเลือด (ประมาณ 0.2–0.3 ml) ทาง femoral artery ที่เวลา 1.5, 3, 5, 8, 15, 20, 25, และ 30 นาที โดยใช้ syringe กลั้วด้วย heparin (500 unit/ml) จากนั้นทำการแยกพลาสมา ด้วยเครื่อง Beckman Microfuge E เป็นเวลาประมาณ 20–30 วินาที

เมื่อเก็บเลือด และน้ำดี ครบตามกำหนดแล้ว นำพลาสมาและน้ำดีมาวิเคราะห์หาปริมาณ ICG ด้วยเครื่อง UV/VIS-Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 800 nm โดยใช้ 1 % BSA ใน normal saline เป็นสารสำหรับทำ dilution (Cherrick et al., 1960)

ในระหว่างทำการทดลอง ควบคุมอุณหภูมิหนู ให้ได้ประมาณ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ โดยใช้เครื่อง Slide Warmer บริษัท C.S.E. Company และวัดอุณหภูมิ ทางทวารหนัก โดยเครื่อง universal oscillograph ทำการทดแทนเลือดที่เสีย ด้วย normal saline ทางหลอดเลือดดำ เป็นระยะ ๆ โดยในขณะผ่าตัด ให้ประมาณ 0.5–1.0 ml/hr และ ทดแทนการสูญเสียเลือด, น้ำดี ด้วย normal saline ในปริมาณประมาณ 1 เท่า

เมื่อทราบความเข้มข้นของ BSP หรือ ICG ในพลาสมา และ ในน้ำดี แล้ว

1. นำความเข้มข้นของ BSP หรือ ICG ในน้ำดี มาคำนวณหา ปริมาณ เปอร์เซนต์การสะสมของ BSP หรือ ICG ในน้ำดี ที่เวลาต่าง ๆ

2. นำความเข้มข้นของ BSP หรือ ICG ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ มาจุดลงบนกราฟ semi-log ระหว่าง ความเข้มข้นของ BSP หรือ ICG ในพลาสมา กับ เวลา ซึ่งข้อมูลจะเข้ากันได้ กับ Two compartment model ตามสมการ Two - exponential (Richards et al., 1959; Barber-Riley et al., 1961) ดังนี้

$$C_t = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$$

C_t คือ ความเข้มข้นของ BSP หรือ ICG ในพลาสมา ณ เวลาต่าง ๆ

A คือ hybrid constant

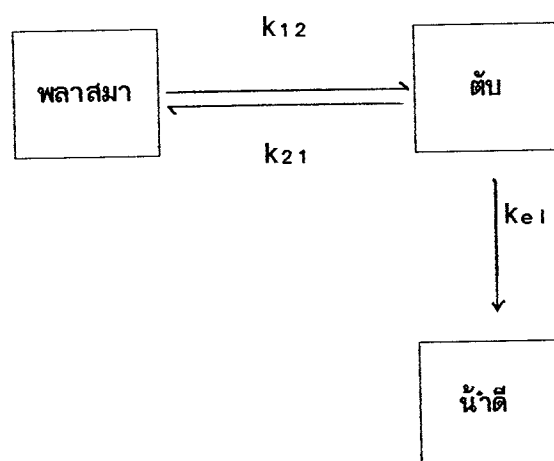
B คือ hybrid constant

α คือ ค่าคงที่ (rate constant) ของการกระจายตัวของ BSP หรือ ICG ไปยัง peripheral compartment

β คือ ค่าคงที่ (rate constant) ของการขจัด BSP หรือ ICG ออกจากร่างกาย

t คือ เวลาต่างๆ หลังจากให้ BSP หรือ ICG

การวิเคราะห์หาค่าคงที่ต่างๆ ดังสมการข้างต้น ใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ คือ MKMODEL และ Sigma-Plot มาทำการวิเคราะห์ นำค่า A, B, α , และ β ไปคำนวณหาค่า และ คำนวณหาค่าคงที่ของการลำเลียงสาร BSP หรือ ICG จากพลาสมาเข้าสู่ตับ (k_{12}), จากตับย้อนกลับสู่พลาสมา (k_{21}) และการขจัด BSP หรือ ICG จากตับสู่น้ำดี (k_{el}) จาก โมเดล และ สมการของ Richards และคณะ (1959) ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยในโมเดลนี้ การ ขีดถ่ายจะเกิดขึ้นที่ peripheral compartment



ภาพที่ 3 โมเดลการลำเลียงสาร BSP หรือ ICG โดยตับ

$$k_{12} = \frac{A * \alpha + B * \beta}{A + B}$$

$$k_{el} = \frac{\alpha * \beta}{k_{12}}$$

$$k_{21} = (\alpha + \beta) - (k_{12} + k_{el})$$

k_{12} คือ ค่าคงที่ของการลำเลียง BSP หรือ ICG จากพลาสมาเข้าสู่ตับ

k_{21} คือ ค่าคงที่ของการลำเลียง BSP หรือ ICG จากตับเข้าสู่พลาสมา

k_{el} คือ ค่าคงที่ของการขจัด BSP หรือ ICG จากตับสู่น้ำดี

นอกจากนี้ ทำการคำนวณหา plasma clearance (CL_T) และ volume of distribution (VD) ของ central และ peripheral (tissue) compartment ของ BSP และ ICG โดยอาศัยสมการการคำนวณ (Gibaldi and Perrier, 1982) ดังนี้

$$CL_T = \frac{\text{dose}}{AUC} \quad \text{ml/min/kg BW}$$

เมื่อ area under the curve : $AUC = A/\alpha + B/\beta$

$$VD \text{ ของ central compartment : } V_1 = \frac{\text{Dose}}{A+B} \quad \text{ml/kg BW}$$

$$VD \text{ ของ peripheral compartment : } V_T = V_1 * k_{12}/k_{21} \quad \text{ml/kg BW}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบทางสถิติ ใช้สถิติ analysis of variance ในการเปรียบเทียบค่าตรวจการทำงานตับทางชีวเคมี และการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง เมื่อทราบว่า มีความแตกต่างภายในกลุ่ม จึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Fisher's LSD comparison report ส่วนการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ และการขับถ่ายสาร BSP หรือ ICG โดยตับ ทำการทดสอบโดยใช้สถิติ Student's t-test กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงถือว่ามีความสำคัญ