

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

โครงการย่อยที่ 1: โฟเพอรินและอนุพันธ์ยับยั้งออกซิเดชันของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ และการนำเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจ

เครื่องมือและอุปกรณ์

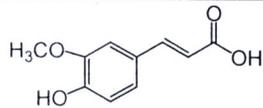
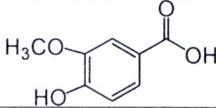
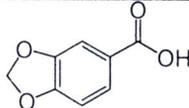
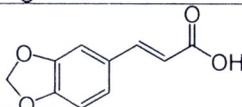
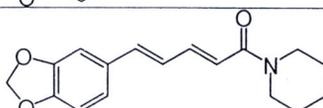
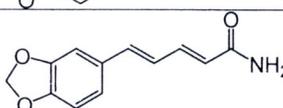
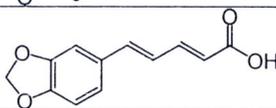
1. Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation)
2. CO₂-incubator (Forma series II, Thermo Fisher Scientific)
3. Laminar air flow (Heal Force[®])
4. Liquid nitrogen tank (Taylor Wharton)
5. Microplate Spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Beckman Coulter)
6. pH meter (Mettler-Teledo)

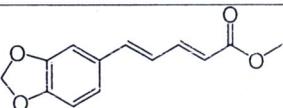
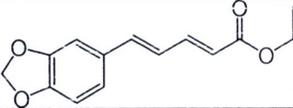
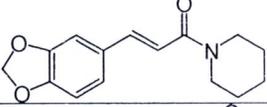
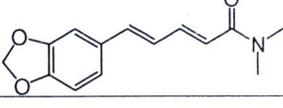
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสังเคราะห์ piperine derivatives

สารสังเคราะห์อนุพันธ์ของ piperine เป็นสารกลุ่ม acids, esters และ amides ตามตารางที่ 1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นันทกา โกรานา

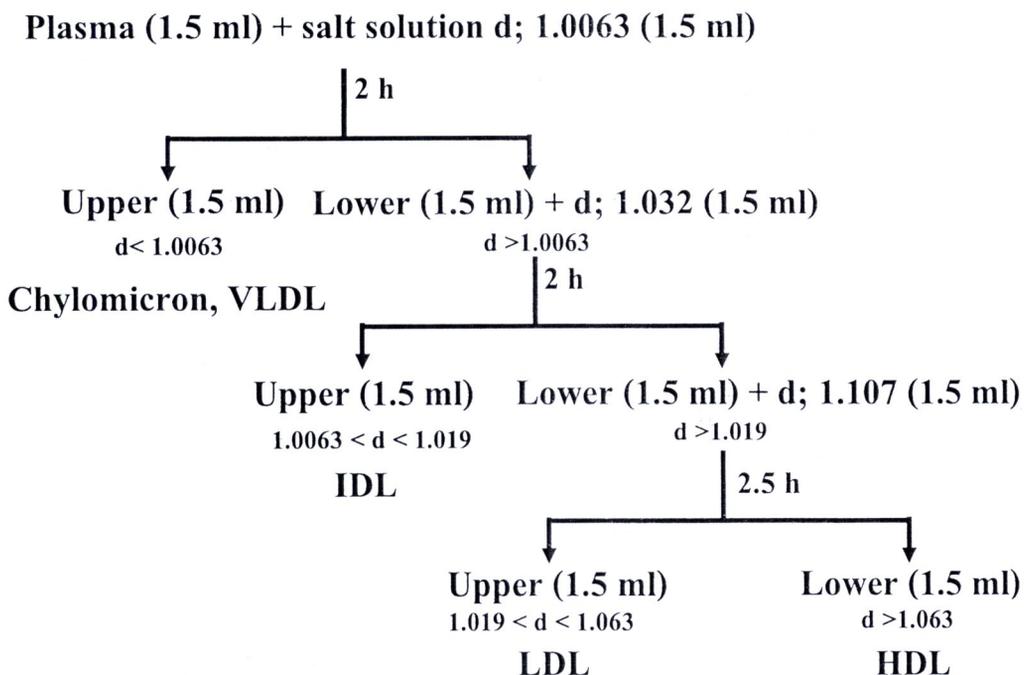
ตารางที่ 1 สารที่ใช้ทดสอบ

Code	Compound
AI-0	
AI-1	
AI-2	
AI-3	
AI-4	
AI-5	
AI-7	

AI-9	
AI-10	
AI-20	
AI-23	

2. การสกัดแยก LDL จากพลาสมา

พลาสมาถูกเตรียมจากเลือดมนุษย์ ที่มีการเติม 0.1% EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยเตรียมจากการนำเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3600 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำไปปั่นแยก LDL ($d = 1.019-1.063$ g/ml) ด้วยวิธี density sequential ultracentrifugation ดังแผนภูมิรูป แล้วนำไป dialyze ใน 1x PBS, pH 7.4 ที่มี 10 μ M EDTA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดหาปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit แล้วเก็บ LDL ที่ได้ภายใต้ N_2 gas ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ศึกษาการเกิด oxidation ต่อไป

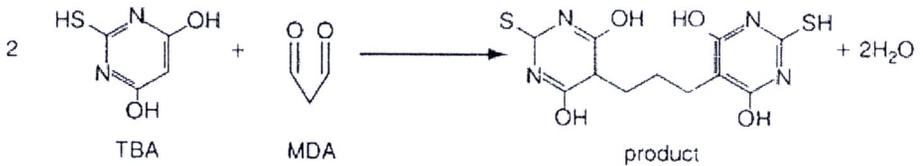


รูปที่ 1 การแยก LDL โดยวิธี density sequential ultracentrifugation (TLX centrifuge, fixed angle rotor, 80,000 rpm, 16.0 °C)

3. การวัด lipid oxidation ด้วย TBARS assay

การวัดปฏิกิริยา lipid peroxidation ด้วย TBARS assay เป็นการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยการเติม TBARS reagent (40% trichloroacetic acid, 1.4% thiobarbituric acid, 8% HCl) แล้ว incubate ที่ 90.0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำไปวัดการเรืองแสง ที่ EX 535 nm และ EM 595 nm

TBA reaction with MDA



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาระหว่าง MDA และ TBA reagent

อ้างอิงจาก: <http://www.currentprotocols.com/protocol/ns0717>

4. การศึกษาผลของ piperine และอนุพันธ์ในการยับยั้ง lipid oxidation ของ LDL

ในการทดสอบผลของไพเพอรีนและอนุพันธ์โดยการเติมแต่ละความเข้มข้นต่างๆ ของ (10, 100, 1000 μ M) ลงไปในปฏิกิริยาของการเกิด lipid oxidation ตามโมเดลที่ได้ศึกษาโดยมีการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการเกิด oxidation ด้วยการเติม 0.1 μ M EDTA แล้วนำไปแช่ใน ice bath จากนั้นนำไปวัด lipid oxidation ด้วย TBARS assay

5. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

การมีชีวิตของเซลล์ก่อน ซึ่งสามารถวัดได้โดยใช้ MTT assay [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl)tetrazolium bromide] โดยเลี้ยงเซลล์ใน 96 well microplate ทำการเติมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้น 2 ชั่วโมงก่อนสิ้นสุดการ treatment ใส่ 20 μ l ของ MTT (5 mg/ml ใน PBS) เมื่อสิ้นสุดเวลา นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วใส่ 200 μ l DMSO:EtOH (1:1) และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย ELISA reader

6. การทดสอบการเป็น reducing agent ด้วยวิธี FRAP

เป็นวิธีการวัดความสามารถการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านออกซิเดชันที่อยู่ในตัวอย่าง โดย Ferric (Fe^{3+})–TPTZ complex (ไม่มีสี) จะถูกรีดิวซ์กลายเป็น Ferrous (Fe^{2+})–TPTZ complex (สีม่วงน้ำเงิน) ในการทดลอง คือ เติมสารที่ต้องการทดสอบจำนวน 20 μ l ลงใน 96 well plate แล้วเติม FRAP solution 180 μ l (300 mM Acetate buffer pH 3.6 : 10 mM TPTZ solution : 20 mM $FeCl_3$ solution อัตราส่วน 10:1:1) แล้ววัดค่า absorbance ที่ 595 nm ที่เวลา 30 นาที แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณ Ferrous (Fe^{2+})

โครงการย่อยที่ 2: ผลของสารไพเพอรีนต่อระดับไขมัน และหน้าที่ของหลอดเลือดในหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

1 การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

ทีมผู้วิจัยได้เสนอรายละเอียดโครงการวิจัย เพื่อขออนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะ กรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยมีรายละเอียดของการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองดังต่อไปนี้

1.1 หลักการและเหตุผลที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของ Piperine ต่อโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง ซึ่งต้องมีการเจาะเลือดเพื่อวัดระดับไขมันในเลือด และต้องแยกหลอดเลือดออกมาศึกษาการทำงาน การศึกษาวิจัยดังกล่าวเป็นชนิด invasive ไม่เหมาะสมที่จะกระทำการศึกษาโดยตรงในมนุษย์ และไม่สามารถทำการทดลองโดยใช้ in vitro model อื่น ๆ เช่น การใช้ cell culture ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความจำเป็นต้องเลือกทำการศึกษาใน in vivo model ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะมีความสำคัญต่อการนำไปอธิบายกลไกของ Piperine ในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด และข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการสนับสนุนการบริโภคสมุนไพรไทยเพื่อส่งเสริมสุขภาพและป้องกันโรคต่อไป

1.2 แนวทางปฏิบัติในการใช้สัตว์

- 1) สัตว์ทดลองจะได้รับการดูแลอย่างดี ในสภาพแวดล้อมที่สะอาดและเหมาะสม
- 2) โครงการวิจัยนี้ได้คำนวณจำนวนหนูทดลองในปริมาณที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงคุณค่าของชีวิตสัตว์ที่นำมาทดลอง และค่าของผลการทดลองที่จะทำให้เกิดนัยสำคัญทางสถิติ
- 3) ทีมผู้วิจัยมีความชำนาญในการ handling หนูทดลองเป็นอย่างดี และจะปฏิบัติต่อสัตว์ด้วยความระมัดระวัง และด้วยความมีเมตตา
- 4) สัตว์จะถูกทำให้ตายอย่างสงบ (euthanasia) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองสำหรับงานวิจัยนี้คือ หนูแรทเพศผู้ (Sprague Dawley rats) น้ำหนัก 150-200 กรัม อายุประมาณ 1 เดือน โดยจะสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล ต.ศาลายา อ.ศาลายา จ. นครปฐม หนูทดลองจะถูกแบ่งกลุ่มเพื่อแยกเลี้ยงในกรง ๆ ละ 2 ตัว เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 25.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ที่ตั้งเวลาเปิดของแสงไฟในห้องเลี้ยง ในช่วงเวลา 07:00-19:00 น. และได้รับอาหารเม็ด (สูตร G082, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม. มหิดล) และน้ำอย่างบริบูรณ์

หนูจะถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะไขมันในเลือดสูงโดยการให้อาหารที่มีส่วนประกอบของ Cholesterol 2,500 mg/kg BW, Bile extract 1,250 mg/kg BW, Coconut oil 1,250 mg/kg BW และ Distilled water 5,000 mg/kg BW

สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

- 1) กลุ่มควบคุม: ได้รับอาหารปกติ

- 2) กลุ่มไขมันในเลือดสูง: ได้รับอาหารไขมันสูงตามสูตรข้างต้น และ Vehicle คือ Propylene glycol ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย Piperine
- 3) กลุ่มไขมันในเลือดสูงที่ได้รับ Piperine (40 mg/Kg BW): ได้รับอาหารไขมันสูงตามสูตรข้างต้น และ ได้รับ Piperine ในขนาด 40 mg/Kg BW โดยเริ่มให้พร้อมกัน และร่วมกันกับอาหารไขมันสูง
- 4) กลุ่มไขมันในเลือดสูงที่ได้รับ Piperine (80 mg/Kg BW): ได้รับอาหารไขมันสูงตามสูตรข้างต้น และ ได้รับ Piperine ในขนาด 80 mg/Kg BW โดยเริ่มให้พร้อมกัน และร่วมกันกับอาหารไขมันสูง
- 5) กลุ่มไขมันในเลือดสูงที่ได้รับยา Symvastatin (2 mg/Kg BW): ได้รับอาหารไขมันสูงตามสูตรข้างต้น และ ได้รับยา Symvastatin ในขนาด 2 mg/Kg BW โดยเริ่มให้พร้อมกัน และร่วมกันกับอาหารไขมันสูง (Vijayakumar and Nalini, 2006)

สัตว์ทดลองจะได้รับสารต่าง ๆ ตามรายละเอียดข้างต้นติดต่อกันนานเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยจะถูกวัดค่าต่าง ๆ ดังนี้

1. วัดน้ำหนักตัวและระดับไขมันในเลือดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง
2. วัดความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจทุก 2 สัปดาห์

หลังจากนั้นสัตว์ทดลองจะถูกทำให้ตายอย่างสงบ แล้วจึงแยกหลอดเลือดแดงเอออดาร์เพื่อนำไปศึกษาการทำงานต่อไป ซากสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตแล้วจะถูกเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ -20°C จนกว่าจะนำไปทำลาย

เกณฑ์การคัดเลือกหรือคัดแยกสัตว์ทดลอง (Inclusion and Exclusion criteria)

ก่อนเริ่มทำการวิจัย ทีมผู้วิจัยจะคัดเลือกหรือคัดแยกหนูทดลอง โดยใช้หลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

- 1) จะเลือกเฉพาะหนูทดลองเพศผู้ ที่มีสายพันธุ์แน่นอน คือ พันธุ์ Sprague Dawley rat ซึ่งจะสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ อ.ศาลายา จ.นครปฐม เท่านั้น
- 2) จะเลือกเฉพาะหนูหนุ่มที่มีขนาดน้ำหนักตัวระหว่าง 150-200 กรัม
- 3) จะไม่เลือกหนูทดลองที่กำลังป่วย มีไข้ หรือมีการติดเชื้
- 4) หนูที่ใช้ต้องมีระดับไขมันปกติ โดยจะเจาะเลือดหนูทุกตัวเพื่อตรวจวัดระดับไขมันก่อนเริ่มทำการทดลอง

เกณฑ์การให้เลิกจากการศึกษา (Discontinuation criteria)

ในขณะกำลังดำเนินการวิจัย ทีมผู้วิจัยมีเกณฑ์ยุติการศึกษา (นอกเหนือจากการสิ้นสุดการวิจัย) โดยใช้หลักดังต่อไปนี้

- 1) หนูทดลองที่มีสภาพร่างกายไม่สมบูรณ์
- 2) หนูทดลองที่ป่วย มีไข้ ติดเชื้ หรือได้รับบาดเจ็บ
- 3) หนูทดลองที่มีความผิดปกติทางจิตและพฤติกรรม เช่น หวาดระแวง ดุร้าย หรือ ก้าวร้าว เป็นต้น
- 4) หนูทดลองที่ถูกคัดออกจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบด้วย CO₂

3 การศึกษาผลของ Piperine ต่อน้ำหนักตัว ความดันเลือดเล็ดเล็ด อัตราการเต้นของหัวใจและระดับไขมันในเลือด

- สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะถูกวัดน้ำหนักสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

- สัตว์ทดลองจะถูกนำมาวัดความดัน Systolic blood pressure และ อัตราการเต้นของหัวใจทุก ๆ 2 สัปดาห์ ติดต่อกันตลอดระยะเวลาที่ศึกษาวิจัย โดยเป็นการวัดความดันเลือดจากหลอดเลือดที่หางโดยใช้อุปกรณ์ Non-invasive Blood Pressure (NIBP) Controller (A.D. Instruments, Castle Hill, Australia) ค่าความดันเลือดที่วัดได้จะถูกบันทึกโดยอุปกรณ์ MacLab A/D converter (Chart V4; A.D. Instruments, Castle Hill, Australia) ทั้งนี้หนูทุกตัวจะถูกฝึกให้อยู่ใน Restrainer เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลองจริงเพื่อลดความเครียดของสัตว์ทดลองที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวัดความดันโลหิต

- การวัดระดับของไขมันจะทำทุก ๆ สัปดาห์ ๆ ละ 1 ครั้ง ติดต่อกันตลอดระยะเวลาที่ศึกษาวิจัย โดยจะเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณหางในปริมาณ 0.5 ml ต่อครั้งต่อตัว เพื่อไปวัดระดับ Total cholesterol, Triglyceride, และ High density lipoprotein โดยวิธี Enzymatic assay

4 การศึกษาผล Piperine ต่อการทำงานของหลอดเลือดเอออดาร์

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง โดยสัตว์ทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบโดยใช้ยาสลบก่อนจึงตัดขั้วหัวใจ แล้วแยกเอาหลอดเลือดแดงเอออดาร์ออกมา จากนั้นจึงนำหลอดเลือดไปแขวนในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Physiological solution หรือ KREBS solution ที่มีส่วนประกอบ คือ NaCl 122 mM; KCl 5 mM; N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid] (HEPES) 10 mM; KH₂PO₄ 0.5 mM; NaH₂PO₄ 0.5 mM; MgCl₂ 1 mM; glucose 11 mM and CaCl₂ 1.8 mM และ ปรับ pH = 7.3 ด้วย NaOH ตลอดจนควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส หลอดเลือดที่แยกได้แล้วจะถูกแขวนด้วยแรงตึงที่ระดับ optimal tension (1 กรัม) และ ทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลอย่างน้อยครึ่งชั่วโมงก่อนทำการทดลองโดยทำการเปลี่ยน KREBS solution ทุกๆ 15 นาที

การตอบสนองของหลอดเลือดจะถูกวัดในรูปการเปลี่ยนแปลงของแรงตึงตัวของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการหยดสาร Phenylephrine (10⁻⁵ M) เพื่อทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อน จากนั้นจึงหยด Acetylcholine (10⁻⁷-10⁻³ M) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยออกฤทธิ์ที่ Endothelium มีผลเพิ่มการหลั่ง Nitric oxide การเปลี่ยนแปลงของแรงที่เกิดขึ้นจะถูกวัดโดยตัวแปลงสัญญาณความแรง (force transducer) และ กราฟการตอบสนองที่ได้จะถูกบันทึกโดยชุดอุปกรณ์แมคแลบคอมพิวเตอร์ (MacLab, ADInstrument, Sydney, Australia)

5 วิเคราะห์ผลการทดลอง

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่า เฉลี่ย (Mean) และ ความน่าเชื่อถือของค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า standard error of the mean (S.E.M) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่มทดลอง จะทำโดยวิธี Student t-test และหรือ ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวนกลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่าง และ ค่า p value <0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โครงการย่อยที่ 3: การวิเคราะห์ผลของสารไฟเพอรินต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

1. การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการให้หนูกินสารไฟเพอรินสัตว์ทดลองจากโครงการย่อยที่ 2 สัตว์ทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบ แล้วแยกเอาตับและอวัยวะส่วนอื่นๆ เช่น ไต, ม้าม, หลอดเลือด, หัวใจ, สมอง เป็นต้น ออกมา ตับและอวัยวะต่าง ๆ ที่ได้จะถูกเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เพื่อคงสภาพการเป็นเนื้อเยื่อไว้ เนื้อตับน้ำหนัก 1 กรัม ถูกนำมาบดด้วยเครื่องบดเนื้อเยื่อ และถูกย่อยด้วยสารเคมี เพื่อทำลายผนังของเซลล์ ตับ โปรตีนที่สกัดได้จะถูกวัดปริมาณด้วยวิธีมาตรฐาน Bradford เพื่อใช้ในการประมาณการแยกด้วยแยกด้วยไฟฟ้าบน SDS-PAGE

2. การแยกโปรตีน

ทำการแยกโปรตีนที่สกัดจากตับโดยใช้ SDS-PAGE ซึ่งสารละลายโปรตีนจะถูกแยกใน 12% acrylamide gel และให้กระแสไฟฟ้าขนาด 10 มิลลิแอมป์เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย 25 มิลลิแอมป์ไปจนกว่าแถบของ bromophenol blue ติดอยู่เบื้องล่างของเจล เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการดังกล่าว สามารถติดตามโปรตีนได้โดยการย้อมสีย้อม Coomassie G-250 หรือ silver stain และสามารถเก็บรักษาสภาพเจลที่ 4 องศาเซลเซียส

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนโดยใช้เทคนิค Mass Spectrometry

หลังจากที่ได้ทำการแยกและเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันมาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีน โดยการตัดเอาแถบของโปรตีนบนเจลตามตำแหน่งโปรตีนมาตรฐานให้มีขนาด 1 X 1 มม. แล้วทำการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) เพื่อตัดสายโพลีเปปไทด์สายยาวให้เป็นสายสั้นๆ (5 ถึง 10 กรดอะมิโน) แล้วเข้าทดสอบด้วยเครื่อง mass spectrometry (LC-MS/MS) โดยเครื่องจะเก็บข้อมูลเป็น peak ของมวลโมเลกุลของแต่ละสายโปรตีน แล้วเทียบ peak ดังกล่าวด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ Decyder™ MS เพื่อระบุความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ และนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ได้เทียบฐานข้อมูลในโปรแกรม MASCOT (Matrix Science Ltd, London, UK) โดยใช้ฐานข้อมูลของ NCBI