

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมน้ำมันเมล็ดทับทิมไทย

- ทับทิม:

ทับทิมที่ใช้ในการทดลองเป็นทับทิมพันธุ์ไทยจากไร่ทับทิมสยาม อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยทำการบดแยกน้ำและกากออกจากกัน นำส่วนที่เป็นกากหรือส่วนเมล็ด ทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วบดด้วยเครื่อง Hammer mill บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 และ 0.2 มิลลิเมตร บรรจุแบบสุญญากาศจนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง การพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ของทับทิมจะถูกส่งไปตรวจสอบที่สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ว่าเป็น *Punica granatum* โดย voucher specimen คือ BKF No. 188578 ตัวอย่างพืชถูกเก็บไว้ที่ห้องเก็บตัวอย่างสมุนไพร พิพิธภัณฑ์พืช สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (Forest Herbarium-BKF)

- น้ำมันเมล็ดทับทิมไทย:

น้ำมันเมล็ดทับทิมไทยที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยในครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไธย์และคณะ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดน้ำมันให้ได้ %Yield สูงที่สุด คือ ความดันในการสกัดที่ 40 MPa อุณหภูมิในการสกัดที่ 55 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการสกัดที่ 120 นาที โดยมีค่าผลผลิตที่ได้คิดเป็นร้อยละ 4.50

3.2 การเตรียมนสัตว์ทดลอง

หนูทดลองพันธุ์ Wistar rats เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักอยู่ในช่วง 200-250 มิลลิกรัม จำนวน 80 ตัว ได้จากการเพาะขยายพันธุ์ขึ้นใช้เองในหน่วยงานคืองานสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมีหลักฐานแสดงสืบสายพันธุ์และ

ความคงที่ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่ต้องการตรวจสอบและมีหลักฐานตรวจสอบได้ว่าเป็นสัตว์เลี้ยงด้วยระบบอนามัยเข้ม

หนูทดลองอาศัยอยู่ในอาคารสัตว์ทดลอง งานสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (12:12 h dark light cycle, ambient temperature $20\pm1^{\circ}\text{C}$) โดยจะได้รับน้ำและอาหารตลอดเวลา

การดำเนินการทดลองอยู่ภายใต้ข้อกำหนดของคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยคำนึงถึงจรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง และได้รับใบรับรองอนุมัติให้ดำเนินการวิจัย จากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้ทำการทำลายซากสัตว์โดยการเผาโดยงานสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมหนูตัดรังไข่ (Ovariectomized rats)

- เลือกหนูทดลองจำนวน 40 ตัว
- วิธีการผ่าตัดรังไข่ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองซึ่งมีรายละเอียดโดยย่อ ดังนี้

- ใส่หนูขาว (Wistar Rats) ในภาชนะแก้วที่มี ether ชุบสำลี (ether chamber) จนหนูสลบติ จากนั้นทำการผ่าตัดรังไข่โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) โดยการจับหนูนอนคว่ำ เตรียมผิวหนังบริเวณแนวกลางหลัง ต่ำกว่ากึ่งกลางลงมาเล็กน้อย กรีดผิวหนังแนวกลางพอติ ดึงผิวหนังไปทางด้านขวา และผ่าตัดกล้ามเนื้อขาหนีบนานไปกับกระดูกสันหลัง โดยให้ห่างจากแนวกลางตัวประมาณ 0.5 นิ้ว เมื่อพบรังไข่ ผูกขั้วของรังไข่ไว้แล้วตัดรังไข่ออก ทำเช่นเดียวกันกับรังไข่ข้างซ้าย แล้วเย็บปิดรอยผ่าที่กล้ามเนื้อและผิวหนัง ดูแลและติดตามผลการทดลองทุกวันว่าได้อาหารและน้ำพอหรือมีการติดเชื้อหรือไม่ เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นดำเนินการทดลองต่อไป

3.3.2 การเตรียมหนูที่ไม่ได้ตัดรังไข่แต่ผ่าตัดหดรอก (Sham operated rats)

- สุ่มเลือกหนูทดลองจำนวน 40 ตัว

- ผ่าตัดเหมือนการเตรียมหนูตัดรังไข่ทั้งสองข้าง แต่ไม่ตัดรังไข่ออก เมื่อผ่าตัดเสร็จ

จะเย็บปิดรอยผ่าที่กล้ามเนื้อและผิวหนัง ดูแลและติดตามผลการทดลองทุกวันว่าได้อาหารและน้ำพอ หรือมีการติดเชื้อหรือไม่ เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นดำเนินการทดลองต่อไป

ภายหลัง 14 วันหลังผ่าตัด แบ่งหนูโดยวิธีการสุ่มออกเป็น 10 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 (Sham + corn oil)

หนูที่ไม่ได้ตัดรังไข่แต่ผ่าตัดหดรอก ถูกป้อนด้วยน้ำมันข้าวโพด (1 ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 2 (Sham + 1000 puniic acid)

หนูที่ไม่ได้ตัดรังไข่แต่ผ่าตัดหดรอก ถูกป้อนด้วย puniic acid (1000 mg/ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 3 (Sham + 2000 puniic acid)

หนูที่ไม่ได้ตัดรังไข่แต่ผ่าตัดหดรอก ถูกป้อนด้วย puniic acid (2000 mg/ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 4 (Sham + 1000 pomegranate seed oil)

หนูที่ไม่ได้ตัดรังไข่แต่ผ่าตัดหดรอก ถูกป้อนด้วยน้ำมันเมล็ดทับทิมไทย (1000 mg/ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 5 (Sham + 2000 pomegranate seed oil)

หนูที่ไม่ได้ตัดรังไข่แต่ผ่าตัดหดรอก ถูกป้อนด้วยน้ำมันเมล็ดทับทิมไทย (2000 mg/ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 6 (OVX + corn oil)

หนูตัดรังไข่ ถูกป้อนด้วยน้ำมันข้าวโพด (1 ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 7 (OVX + 1000 puniic acid)

หนูตัดรังไข่ ถูกป้อนด้วย puniic acid (1000 mg/ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 8 (OVX + 2000 puniic acid)

หนูตัดรังไข่ ถูกป้อนด้วย puniic acid (2000 mg/ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 9 (OVX + 1000 pomegranate seed oil)

หนูตัดรังไข่ ถูกป้อนด้วยน้ำมันเมล็ดทับทิมไทย (1000 mg/ml/kg, P.O.)

- กลุ่มที่ 10 (OVX + 2000 pomegranate seed oil)

หนูตัดรังไข่ ถูกป้อนด้วยน้ำมันเมล็ดทับทิมไทย (2000 mg/ml/kg, P.O.)

หมายเหตุ corn oil ซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich, USA และ puniceic acid ซื้อมาจากบริษัท Haohua Industry Co.,Ltd., China

ทำการป้อนสารตามที่กำหนดทุกวัน เป็นเวลา 28 วัน โดยวิธีการป้อนได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองซึ่งมีรายละเอียดโดยย่อดังนี้ จับหนูแล้วหงายมือขึ้นให้หนูอยู่ในท่าตั้งฉากกับพื้น สอดท่อ (ที่หล่อลื่นท่อนก่อนโดยใช้น้ำทาให้เปียก) ผ่านหลอดอาหารลงสู่กระเพาะ การสอดท่อจะสัมพันธ์กับจังหวะการกลืน (ถ้าสัตว์แสดงอาการขย้อนให้เห็นแสดงว่าสอดเข้าหลอดอาหารแล้ว) ความลึกที่สอดท่อเข้าไปให้วัดจากปากถึงปลาย Sternum ขนาดท่อใช้ขนาด 16-17×2 ½ นิ้ว ปริมาณสารสกัดที่ให้ไม่เกิน 1.0 มิลลิตร

ทำการชั่งน้ำหนักของ food intake ทุกวัน และน้ำหนักตัวทุกสัปดาห์

เมื่อครบ 28 วัน หนูทดลองได้ถูกอดอาหารเป็นเวลา 10 ชั่วโมงก่อนทำให้หนูสลบด้วย pentobarbital sodium (Nembutal, CEVA SANTE ANIMMALE, France, 50 mg/kg, i.p.) แล้วจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจอย่างรวดเร็ว แล้วนำไป centrifuge แยก plasma แล้วเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์หา Plasma parameters ต่อไป คือหาระดับของ glucose, Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) โดยจะวิเคราะห์ด้วย automatic blood analyzer (Hitachi, Japan) [61]

visceral adipose tissue (epididymal, perirenal, mesenteric adipose tissues) ตับ หัวใจและไต จะเอาออกมาอย่างรวดเร็วแล้วชั่งน้ำหนัก เพื่อหา relative organ weigh (ROW) โดยคำนวณตามสูตรนี้

$$ROW = (\text{weight of organ (g)} \div \text{body weight of rat (g) on the day of sacrifice}) \times 100\%$$

การทำให้สัตว์ตายอย่างสงบ:

หลังเสร็จสิ้นการทดลอง ได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองโดยให้ sodium pentobarbitone ทางช่องท้อง แล้วสังเกตให้แน่ใจว่าหนูหยุดหายใจแล้วนำซากไปทำลายที่อาคารสัตว์ทดลอง

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย Student *t*-test และวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) โดยโปรแกรม SigmaStat (SigmaStat software 3.5; St. Louis, MO, USA) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะยอมรับเมื่อ *P*-value มีค่าน้อยกว่า 0.05

กราฟในทุกรูปภาพสร้างโดยใช้โปรแกรม SigmaPlot software version 10, Systat Software Inc., USA)

3.5 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

- ห้องปฏิบัติการชั้น 4 อาคารเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษาบรมราชินีนาถ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- อาคารศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี