

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูขาวเล็ก (mice) น้ำหนัก 20-22 กรัม ถูกเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง 1 สัปดาห์ก่อนทำการทดลองเพื่อปรับสภาพ โดยให้สัมผัสกับแสงสว่างและความมืดสลับกัน ทุก 12 ชั่วโมง และได้รับอาหารและน้ำไม่จำกัด

ในการทดลองหนูขาวเล็กถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาวเล็กที่ได้รับน้ำเกลือ 0.9% โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ

กลุ่มที่ 2 หนูขาวเล็กที่ได้รับ pentylenetetrazole (PTZ) ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดอาการชัก ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการชัก

กลุ่มที่ 3 หนูขาวเล็กที่ได้รับ sodium valproate ขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม** โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน หลังจากนั้น 45 นาที จะได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการชักและได้รับยารักษาโรคลมชัก sodium valproate

กลุ่มที่ 4 หนูขาวที่ได้รับ piperine ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม*** โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน หลังจากนั้น 45 นาที จะได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 5 หนูขาวที่ได้รับ piperine ขนาด 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม*** โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน หลังจากนั้น 45 นาที จะได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 2

กลุ่มที่ 6 หนูขาวที่ได้รับ piperine ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม*** โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน หลังจากนั้น 45 นาที จะได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 3

หมายเหตุ

* ขนาดของ PTZ ที่ใช้ในการวิจัยนี้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ Agarwal et al. (2011)

** ขนาดของ sodium valproate ที่ใช้ในการวิจัยนี้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ Brahmane et al. (2010)

*** ขนาดของ piperine ที่ใช้ในการวิจัยนี้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ D'Hooge et al. (1996) และ Mori et al. (1985)

2. การเตรียมสมองของสัตว์ทดลอง

หลังจากเสร็จสิ้นการเตรียมสัตว์ทดลองในข้อ 1 สมองของหนูขาวเล็กในแต่ละกลุ่มถูกนำมาตัดเป็นแผ่นบาง (sectioned) ให้มีความหนา 10 μm โดยใช้ cryostat microtome ที่อุณหภูมิประมาณ -20°C และแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ซึ่งประกอบด้วยสมองส่วน frontal cortex, temporal cortex และ hippocampus ถูกทำให้แห้งบนแผ่น slide แก้ว และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อใช้ในการศึกษาระดับของ NMDA และ GABA_A receptors โดยวิธี autoradiography ต่อไป

3. การศึกษาระดับของ NMDA receptors โดยใช้วิธี autoradiography

Slide แผ่นเนื้อเยื่อในข้อ 2 ถูกนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป incubate ด้วย 5 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นถูก incubate ด้วย 5 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 ที่มี 100 μ M glutamate, 30 μ M glycine, 50 μ M spermidine และ 5 nM [3 H]dizocilpine maleate ([3 H]MK-801) เป็นเวลา 60 นาที สำหรับระดับของ non-specific NMDA receptor binding slide แผ่นเนื้อเยื่อถูก incubate ด้วย Tris-HCl buffer ที่มี glutamate, glycine, spermidine, [3 H]MK-801 และ 0.1 mM (+)MK-801 เมื่อครบเวลา incubate แล้ว slide แผ่นเนื้อเยื่อ ถูกล้างใน 5 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 ที่เย็น เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปจุ่มใน reverse osmosis water ที่เย็น และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปวางประกบเทียบกับแถบ tritium มาตรฐานบน Hyperfilm เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4. การศึกษาระดับของ GABA_A receptors โดยใช้วิธี autoradiography

Slide แผ่นเนื้อเยื่อในข้อ 2 ถูกนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป incubate ด้วย 50 mM Tris-citrate buffer pH 7.0 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นถูก incubate ด้วย 50 mM Tris-citrate buffer pH 7.0 ที่มี 3 nM [3 H]muscimol เป็นเวลา 45 นาที สำหรับระดับของ non-specific NMDA receptor binding slide แผ่นเนื้อเยื่อถูก incubate ด้วย Tris-HCl buffer ที่มี glutamate, glycine, spermidine, [3 H]muscimol และ 0.01 mM GABA เมื่อครบเวลา incubate แล้ว slide แผ่นเนื้อเยื่อ ถูกล้างใน 50 mM Tris-citrate buffer pH 7.0 ที่เย็น เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปจุ่มใน reverse osmosis water ที่เย็น และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปวางประกบเทียบกับแถบ tritium มาตรฐานบน Hyperfilm เป็นเวลา 4 สัปดาห์

5. การวิเคราะห์ระดับของ NMDA และ GABA_A receptors

Hyperfilm ถูกล้างหลังจากวางประกบกับ slide แผ่นเนื้อเยื่อเมื่อครบตามกำหนดเวลา จากนั้น autoradiographs ที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์หาระดับของ NMDA และ GABA_A receptors โดยใช้ Quantity One[®] 1-D analysis software (Bio-Rad Laboratories, USA) และผลที่ได้ถูกนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้การคำนวณทางสถิติแบบ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05