บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย และผลการวิจัย

2.1 สัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200-250กรัม โดยสั่งซื้อจาก ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ. นครปฐม โดยทำการเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยควบคุมสิ่งแวดล้อมในห้องเลี้ยงที่มีอุณหภูมิห้อง 25 $\pm$ 1°C อัตราส่วนแสงสว่างกลางวันกับกลางคืน 12:12 โดยมีการจัดสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมทั้งอาหาร และน้ำ อย่างบริบูรณ์ โดยมีจำนวนการใช้สัตว์ทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1.

การใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยได้ยื่นเสนอขอรับรองจริยธรรมในการใช้สัตว์ แบบเต็มรูปแบบ ต่อคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตารางที่ 1. กลุ่มทดลอง และจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้

ลำดับ	กลุ่มการทดลอง / การศึกษา	จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้
1	ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบของแก่นไม้กฤษณาต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจส่วน Ventricle โดยทดลองความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ หลายความเข้มข้น	3
2	การทดสอบการตายของเซลล์ กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทเมื่ออยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia)	3
3	ทดสอบการเกิดกระบวนการ Apoptosis ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทที่อยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง	3
4	ทดสอบการยับยั้งการบวนการ Apoptosis ของสารสกัดจากแก่นไม้กฤษณา ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทที่อยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง	3
5	การวิเคราะห์Signaling Proteins ที่ถูกกระตุ้นโดย western blot	3
6	สัตว์ทดลองสำรอง	5
รวมจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้		**20**

หมายเหตุ: เซลล์ที่แยกได้จากหัวใจของหนูแรท 1 ตัวสามารถแยกได้เซลล์ประมาณ 4- 6 ชุดของ 6-well plate ที่ความเข้มข้นของเซลล์ $4x10^5$- $1x\ 10^6$ cells/well

หมายเหตุ:ผู้วิจัยได้ตระหนักและเล็งเห็นถึงคุณค่าของสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทำวิจัย และได้พิจารณาอย่างรอบคอบแล้ว ว่าไม่มีวิธีการอื่นที่เหมาะสมเท่า โดยผู้วิจัยยึดหลักความประพฤติอันเหมาะสม โดยคำนึงถึงคุณธรรม และ จริยธรรมในการทำวิจัยที่ใช้สัตว์ทดลอง ตลอดจนได้ตระหนักถึงความสำคัญด้ายความน่าเชื่อถือและความ เที่ยงตรงของข้อมูลจากผลการทดลอง และวิจัย โดยการเลือกชนิด สายพันธ์ที่เหมาะสมที่สุด และจำนวน สัตว์ทดลองที่น้อยที่สุด ที่ทำให้ผลการทดลองน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ ผู้วิจัยตระหนักว่าสัตว์ทดลองเป็นสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับมนุษย์ และจักปฏิบัติต่อสัตว์ด้วยความระมัดระวังทุกขั้นตอน ผู้วิจัยได้บันทึกข้อมูลการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองตามวิธีการที่เสนอในโครงการวิจัย ตลอดจนบันทึกไว้เป็นหลักฐานที่จะเปิดเผยหรือชี้แจงได้ทุกโอกาส

2.2 ตัวอย่างแก่นไม้กฤษณาและการพิสูจน์สายพันธุ์

กฤษณาที่นำมาใช้ คือ สายพันธุ์ *Aquilaria crassna* Pierre Lecomte ได้รับจาก นายชูศักดิ์ เรืองรัตนภูมิ ปลูกในพื้นที่เขตอำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ โดย อ.ดร. ปราณี นางงาม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร Specimen number 002540 ถูกเก็บไว้ที่หอพรรณไม้ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร

2.3 สารสกัดจากแก่นไม้กฤษณา

ได้รับการอนุเคราะห์โดย อ.ดร.ภานุมาศ ทองอยู่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ซึ่งมีวิธีการสกัดโดยย่อ คือทำการเก็บตัวอย่างจากลำต้นกฤษณา เลือกเฉพาะส่วนแก่นไม้ นำมาสับให้เป็นชิ้นเล็กและนำมาทำให้แห้งในที่ร่ม เมื่อแห้งดีแล้ว นำมาบดเป็นผงละเอียด โดยครก ผงที่ได้จากการบ่นแก่นไม้กฤษณา ประมาณ 100 กรัม นำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (EtOAc) ที่อุณหภูมิ 60 – 80 องศาเซลเซียส โดยใช้ชุดเครื่องมือ soxlet เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้จะนำมาทำให้เข้มข้นโดย vacuum และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2.4 การแยกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท และ การเพาะเลี้ยงเซลล์ และทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์

ทำการแยกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจส่วน Ventricle จากหัวใจหนูแรทสายพันธ์ Wistarเพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม (จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ทำให้สลบด้วยการฉีดยาสลบชนิด pentobarbital (300 mg/kg) และ heparin (150 units) ทาง Intraperitonealเมื่อหนูสลบดีและตรวจสอบว่าหมดความรู้สึกแล้ว ทำการผ่าตัดเปิดช่องอก และทำการตัดหัวใจ หัวใจที่ตัดออกมา

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ทำการ perfused ด้วย Tyrode solution (130 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1.4 mM $MgCl_2$, 0.4 mM NaH_2PO_4, 0.75 mM $CaCl_2$, 4.2 mM HEPES, 20 mM taurine, 10 mM creatineและ 10 mM glucose 9, ปรับ pH 7.3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ทำการ perfused อีกครั้งด้วย calcium – free Tyrode solution + EGTA เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Solution 3 (Tyrode solution + 100 µM $CaCl_2$และ 1 mg/ml collagenase type II) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นติดชิ้นเนื้อของกล้ามเนื้อหัวใจช่องล่างชิ้นเล็ก ๆ ทำการย่อยเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจช่องล่างต่อด้วยเอนไซม์ 1 mg/ml collagenases type II ด้วยการไปเปตขึ้นลง เพื่อให้เกิดการย่อยเซลล์ได้ละเอียดมากขึ้น ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นทำการกรองเพื่อแยกเซลล์ด้วย nylon gauze นำเซลล์ที่กรองได้ไปปั่นเบาที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วน supernatant ทิ้ง เซลล์ที่แยกได้จะถูก resuspend ด้วย Solution 4 (Tyrode solution + 0.5 mM $CaCl_2$ และ 1% (w/v) Bovine serum albumin) ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นเบาที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการ resuspend cell pellet ด้วย Solution 5 (Tyrode solution + 1 mM $CaCl_2$) จากนั้นทำการ ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และ ปั่นเบาที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีแล้วจึงนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปลอดเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Modified M199 เพาะเลี้ยงที่ตู้บ่มเพาะเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 95% O_2 + 5% CO_2

2.5 สภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

สภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) ทำได้โดยใช้ ischemic buffer ที่มีส่วนประกอบของ 137 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 0.49 mM $MgCl_2$, 0.9 mM$CaCl_2$, และ 4.0 mM HEPES ที่มี 10 mM 2-deoxyglucose, 20 mM sodium lactate, และ 1 mM sodium dithionite pH 6.5 ซึ่งจะจำลองสภาวะการขาดออกซิเจนและขาดแหล่งให้พลังงาน

2.6 การทดสอบหาอัตราส่วนจำนวนเซลล์ที่ตายและเซลล์รอดชีวิตด้วย MTT Cell survival assay

MTT Cell survival assay โดยมีหลักการคือ MTT จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบสีม่วง formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase ในไมโตรคอนเดรียในเซลล์ที่มีชีวิต สารประกอบสีม่วงจะถูกละลายได้ใน isopropanol - HCl โดยการเติม MTT ที่ผสมกับ DMEM ลงไปใน 6 – Well plate 2 ml. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นดูด MTT ทิ้งแล้วเติม 0.04 M HCl ใน absolute isopropanol 1 ml ดูดสารละลายใส่ไม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 7 ธ.ค. 2555
เลขทะเบียน 190951
เลขเรียกหนังสือ

โครทิว นำไปปั่นเพื่อตกตะกอนความเร็ว 1,300 rpm. 2 นาที เก็บส่วนใส่เพื่อนำไปทำการตรวจวิเคราะห์การดูดกลืนแสงซึ่งค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 570 nm และ 650 nm

2.7 การทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogynase (LDH activity)

Lactate dehydrogynase (LDH activity) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนระหว่างแลคเตทและไพรูเวต มีในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งจะหลั่งออกมาจากเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บและผนังเซลล์มีรูรั่วทำให้เอนไซม์หลั่งออกมาจากเซลล์ โดยการเติม Working LDH 1 ml. และ Sample 10 µl. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อ่านผลที่ความยาวคลื่น 340 nm ทำการวัดค่าที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 นาที

2.8 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา

ทำการทดสอบความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในความเข้มข้นต่างๆโดยแยกกลุ่มทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1: Control (ตัวทำละลาย DMSO) เป็น Negative control

กลุ่มที่ 2-11: เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ความเข้มข้น 1 -10 mg/ml ใน Ischemic buffer

ทดสอบหาอัตราส่วนจำนวนเซลล์ที่ตาย และเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย MTT Cell survival assay และทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiments) วิเคราะห์คำนวนค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติ ANOVA หากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.9 การทดสอบความสามรถของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ จากภาวะขาดเลือดจำลอง

การทดสอบการตายของเซลล์ กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทเมื่ออยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia)ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท (Adult Rat Ventricular Myocytes, ARVMs) และศึกษาผลของสภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate ischaemia) โดยใช้ischaemic buffer ที่มีส่วนประกอบของ 137 mM NaCl, 3.8

mM KCl, 0.49 mM MgCl2, 0.9 mMCaCl2, and 4.0mM HEPES ที่มี 10mM 2-deoxyglucose, 20mM sodium lactate, และ 1 mM sodium dithionite at pH 6.5 ซึ่งจะจำลองสภาวะการขาดออกซิเจนและขาดแหล่งให้พลังงาน ในสภาวะที่มี และไม่มีการให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา และทดสอบปริมาณ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในความเข้มข้นต่างๆ โดยแยกกลุ่มทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1: Control

กลุ่มที่ 2: Control (ตัวทำละลาย DMSO) with Ischemic buffer

กลุ่มที่ 3-12: เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ความเข้มข้น 1 -10 mg/ml ใน Ischemic buffer

ทดสอบหาอัตราส่วนจำนวนเซลล์ที่ตาย และเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย MTT Cell survival assay และทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiments) วิเคราะห์คำนวนค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติ ANOVA หากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.10 การวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธี SDS – PAGE และ western blot

สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS – PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ดูการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยใช้หลักการของ gel electrophoresis เพาะเลี้ยงเซลล์ ARVMs บน 6 – well plate ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 5 mg/ml. เป็นเวลา 60 นาที กระตุ้นภาวะขาดเลือดจำลอง (SI) 120 นาที หลังจากนั้นทำให้เซลล์เสียสภาพโดยการต้มเป็นเวลา 5 นาที ในสารละลาย 2xSDS sample buffer (0.25 M tris – HCl pH 6.8, 40% glycerol, 6% SDS, 0.08% bromophenol blue, 4% β-mercaptoethanol) จากนั้นนำโปรตีนมาแยกใน polyacrylamide gel 10% (การเตรียม 10% acrylamide เตรียมได้จาก 30% bis-acrylamide, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 10% ammonium persulfate, 0.04% TEMED ที่มี stacking gel -v' 4% acrylamide เตรียมได้จาก 30% bis-acrylamide, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 10% ammonium persulfate, 0.1% TEMED) นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยความต่างศักย์ 90 volt 10 นาที และ 120 volt เป็นเวลา 60 นาที ใน SDS containing Tris-glycine buffer pH8.3 (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS) จากนั้นทำการถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่ Polyvinylidene fluoride (PVDF) Tranfer membrane

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ด้วย electroblotting 20 volt เป็นเวลา 60 นาที ด้วย transfer buffer (25 mM Tris base pH 8.5, 200 mM glycine, 20% methanol) จากนั้นนำ PVDF ที่ทำการกระตุ้นโปรตีนแล้วมา block ด้วย 5% non-fat dry milk ใน TBS ที่มี 0.1% Tween – 20 (TBST) ทิ้งไว้ที่อุนหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 1:1000 primary antibody (Total หรือ Phospho p38 MAPK antibody: Rabbit polyclonal IgG from Santa Cruz Biotechnology) incubate over night ที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดล้างด้วย TBST 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเติม 1:1000 Secondary Antibody หลังจากนั้น conjugated ด้วย anti goat – HRP incubate ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นล้างด้วย TBST 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงทำปฏิกิริยา chemiluminescence กับ ECL Substrate 1 นาที (ECL: Amersham Pharmacia Biotech) ทำการประกบแผ่น PVDF บนแผ่นฟิลม์ (Hyperfilm) ในที่มืด วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวัดค่าความเข้มแสงของแถบ (Band Intensity) ที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นฟิล์ม และนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบ และหาความมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiments) โดยใช้โปรแกรม Image J ในการวิเคราะห์ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติ ANOVA หากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.11 การวิเคราะห์ข้อมูล

หาช่วงเวลาที่น้อยที่สุดที่เซลล์ตายจากภาวะขาดเลือดจำลองอย่างมีนัยสำคัญ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดจำนวนเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง ทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ลดการตายของเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลองอย่างมีนัยสำคัญ หาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ลดการตายของเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง และหาผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาต่อการตายของเซลล์หัวใจเนื่องจากภาวะหัวใจขาดเลือดจะมีความสามารถในการปรับปรุง/ซ่อมแซม รูปร่างและโครงสร้าง (Cytoskeletal) ของ F-actin ที่ถูกทำลายจากการกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลอง โดยใช้สถิติ mean±S.E. Data, วิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA และ Tukey's Post Hoc, A value < 0.05 และโปรแกรม PRISM 5.0