วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

นำเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสกัดด้วยเฮกเซนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดส่วนไขมันลิปิด หลังจากสกัดเอาเฮกเซน ออกทำการสกัดส่วนที่เหลือสกัดในเมธานอล 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วระเหยส่วนเมธานอลออกโดยใช้ Rotary evaporator นำส่วนสารสกัดที่ได้ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน เพื่อใช้ป้อนหนูขาวต่อไป

2. การตรวจวัด องค์ประกอบเคมีที่สำคัญในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

2.1 การตรวจวัดระดับ Total phenolic compounds โดยวิธี Folin-Ciocateau Method

เติม Folin-Ciocateau reagent ลงในหลอดที่มีสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม 7%Na_2HCO_3 นำไปอุ่นที่ 45 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm หาความเข้มข้นของสารประกอบโพลี่ฟีนอล โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2 การตรวจวัดระดับ Total flavonoids content ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric method

เติม 5% $NaNO_2$ และ10% $AlCl_3.6H_2O$ ลงในหลอดที่มีสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พอครบเวลาเติม1 M NaOH ซึ่งจะทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองสาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

2.3 การตรวจวัดระดับ Condensed tannins (proanthocyanidins) โดยวิธี Vanillin Assay

เติม Standard หรือ สารตัวอย่าง ลงในหลอดทดลองที่มี Vanillin reagent ผสมให้เข้ากัน เติม 4% conc. HCl นำไปอุ่นที่ 30 °C เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm หาความเข้มข้นของสาร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.4 การศึกษา Phenolic compounds ด้วยวิธี Choromatography-Electrospray ionization mass spectrometry

เตรียมตัวอย่างสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเมทานอลมาทำการละลายในตัวทำละลายเมทานอลที่มีกรดผสมอยู่ จากนั้นนำไประเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดที่แห้งแล้วมาปรับปริมาตรให้มีปริมาตรให้เป็น 5 มล. นำสารละลายที่ได้มากรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง LC-MS เพื่อทำการวิเคราะห์ผลต่อไป รายละเอียดและผลการทดลองอยู่ในภาคผนวก

3. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

ใช้หนูพันธุ์ Wistar เพศผู้อายุ 6 สัปดาห์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ใช้หนู 5 ตัว ป้อนน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในวันแรกของการทดลอง

กลุ่มที่ 2 ใช้หนู 8 ตัว ป้อนสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้น 2 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในวันแรกของการทดลอง

สังเกตลักษณะเปลี่ยนแปลงโดยทั่วไป จำนวนการตายของหนูภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น สังเกตต่อจนครบ 2 สัปดาห์ แล้วจึงทำการสลบด้วยไดเอทธิลอีเธอร์ ชั่งน้ำหนักของอวัยวะต่อไปนี้ ตับ ไต ม้าม และปอด บันทึกน้ำหนักตัวหนู ปริมาณอาหารและน้ำดื่ม 2 ครั้งต่อสัปดาห์

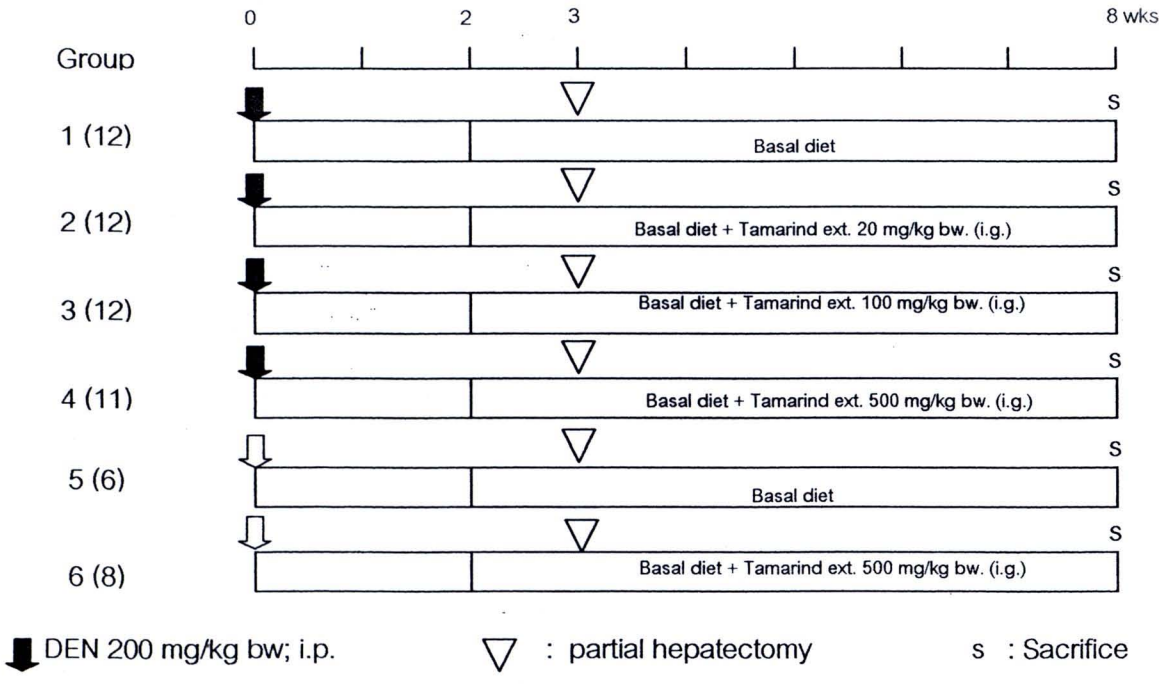
4. การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

แบ่งหนูพันธุ์ Wistar เพศผู้ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรก เป็นกลุ่มควบคุม ใช้หนู 6 ตัวป้อนน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน กลุ่มที่ 2 ถึง 4 เป็นกลุ่มทดลอง ใช้หนูกลุ่มละ 8 ตัว ป้อนด้วยสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 20, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ เป็นเวลา 14 วัน

บันทึกน้ำหนักตัวหนู ปริมาณอาหารและน้ำดื่ม 2 ครั้งต่อสัปดาห์ วันที่ 15 ของการทดลอง ทำการสลบด้วยไดเอทธิลอีเธอร์ และเปิดช่องท้องเพื่อเก็บเลือดสำหรับวิเคราะห์หาค่า AST, ALT และ ALP ชั่งน้ำหนักของอวัยวะต่อไปนี้ ตับ ไต ม้าม และปอด ส่วนตับเก็บใน Eppendorf tube แช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บในตู้แช่แข็ง -80°ซ เพื่อใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

5. การทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งตับหนูขาวของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (Ito Model; Medium-tern rat liver carcinogenicity test)

ใช้หนู Wistar เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 56 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มทดลองดังรูปภาพ โดยเริ่มต้นการทดลองด้วย กลุ่มที่ 1-4 ฉีด Diethylnitrosamine (DEN) 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และกลุ่มที่5-6 ฉีด Normal Saline Solution (NSS) 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หลังจากนั้น 2 สัปดาห์เริ่มป้อนสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 20, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (กลุ่มที่ 2-4 และ 6) และกลุ่มที่ 1 และ 5 ป้อนน้ำ 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ทำการตัดตับออกบางส่วน (Partial Hepatectomy) เมื่อครบ 8 สัปดาห์ของการทดลอง ทำการสลบหนูด้วย Diethylether เปิดช่องท้องเพื่อเก็บเลือดหนูสำหรับวิเคราะห์ค่า AST, ALT และ ALP ชั่งน้ำหนักตับ ไต ม้าม และปอด หลังจากนั้นส่วนตัดตับส่วน Right, Median และ Left lateral lobe ส่วนละ 1 ชิ้นขนาดหนา 4-5 มิลลิเมตร แช่ใน 10% Buffered formalin เพื่อใช้ในการศึกษาในระดับชิ้นเนื้อ(Hematoxylin&Eosin staining, Immunohistochemistry of GST-P and PCNA) ต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บใน Eppendorf tube แช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บในตู้แช่แข็ง -80°ซเพื่อใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป บันทึกน้ำหนักตัวหนู ปริมาณอาหารและน้ำดื่มทุกสัปดาห์



6. การตรวจพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อตับหนู

หลังจากชิ้นเนื้อตับแช่ในสารละลายฟอร์มาลินบัฟเฟอร์ 72 ชั่วโมง ทำการ Dehydration และฝังส่วนชิ้นเนื้อตับในพาราฟิน หั่นชิ้นเนื้อให้มีความหนา 4 ไมครอน สำหรับย้อมด้วย Hematoxylin & Eosin แล้วเช็คการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

7. การตรวจนับจำนวน GST-P positive foci และ PCNA จากชิ้นเนื้อตับหนู

GST-P (Glutathione *S*-transferase placental form) positive foci เป็นรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็ง (Preneoplastic lesions)ตับที่สัมพันธ์กับมะเร็งที่เกิดขึ้นในตับของหนูขาว ย้อมชิ้นเนื้อตับที่มีความหนา 4 ไมครอน ด้วย Rabbit polyclonal Anti rat GST-P antibody ตามวิธีของ Puatanachokchai และคณะ นับจำนวน Foci ที่ย้อมติดสีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางอย่างน้อย 0.2 มิลลิเมตร

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) index เป็นดรรชนีชนิดหนึ่งบ่งบอกการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ย้อมชิ้นเนื้อตับที่มีความหนา 4 ไมครอน การทดลองนี้เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PCNA ในส่วนชิ้นเนื้อตับที่ให้ผลบวกกับ GST-Pกับด้วยส่วนชิ้นเนื้อตับที่ให้ผลลบกับ GST-P โดยใช้วิธี Double-immunohistostaining ด้วย Mouse monoclonal Anti PCNA antibody และ Rabbit polyclonal Anti rat GST-P antibody ตามวิธีของ Puatanachokchai และคณะ PCNA จะถูกย้อมติดในส่วนนิวเคลียสของ Hepatocytes ด้วยสีน้ำตาลของ DAB (3'-3'-Diaminobenzidine) และ GST-Pจะถูกย้อมติดในส่วน Cytoplasm ของ Hepatocytes ด้วยสีแดงของ New fuchsin substrate system นับจำนวน PCNA positive cell ต่อ Hepatocytes อย่างน้อย 3000 เซลล์

8. การตรวจระดับ AST, ALT และ ALP ในซีรั่มหนูขาว

ปั่นแยกซีรั่มจากเลือดที่เจาะได้ด้วยเครื่องCentrifuge 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°ซ นำส่วนซีรั่มที่ได้ ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ตรวจวัด activity ของ AST, ALT และ ALP ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของแต่ละเอนไซม์

9. การวัดปริมาณ TBARS ในตับ

ปั่นชิ้นเนื้อตับในสารละลาย sodium phosphate-EDTA buffer pH 7.0 อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ นำ homogenate ที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย trichloroacetic acid ทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการปั่นแยกตะกอนโปรตีนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บส่วนใสชั้นบน (supernatant) มาทำการวิเคราะห์ปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยนำส่วน supernatant มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย thiobarbituric acid ที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 °ซ แล้วแยก

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา (2TBA-MDA complex) ด้วย butanol แล้วนำชั้นของ butanol ไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยเทียบความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้ในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ แล้วนำค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

10. การวัดปริมาณกลูตาไธโอนโดยวิธี glutathione reductase recycling method

ปั่นชิ้นตับใน Sodium phosphate-EDTA buffer pH 7.5 แล้วทำการปั่นแยกเอาส่วน supernatant ด้วยเครื่อง centrifuge อุณหภูมิ 4 °ซ นำส่วน supernatant ที่ได้มาหาปริมาณกลูตาไธโอนโดยทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย metaphosphoric acid ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการปั่นแยก supernatant ด้วยเครื่อง centrifuge

ทำการหาปริมาณกลูตาไธโอนโดยนำตัวอย่างที่ทำการตกตะกอนโปรตีนแล้วมาเติมสารละลายผสมของ sodium phosphate-EDTA buffer pH 7.5, B-NADPH และเอนไซม์ glutathione reductase ในเพลท 96 หลุม ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำการเติมสารละลาย 5, 5′-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB) แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ เมื่อครบเวลาจะได้สารละลายสีเหลืองแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

11. การเตรียม Homogenate จากชิ้นเนื้อตับเพื่อหากัมมันตภาพของเอนไซม์

ปั่นชิ้นเนื้อตับใน perfusion buffer ด้วยเครื่อง tissue homogenizer นำ homogenate ที่ได้ไปปั่นแยก supernatant ออกจากตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นำ supernatant ที่แยกได้ไปปั่นแยกต่อด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็ว 105,000 g เป็นเวลา 60 นาที 4°C จากนั้นดูดแยกส่วนใส ซึ่งเป็นส่วนไซโตซอล และส่วนไมโครโซมได้จากละลาย pellet ด้วย microsome suspension buffer pH 7.4 เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป โดยทำการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ก่อนการวิเคราะห์

12. การวัดปริมาณโปรตีนในชิ้นเนื้อตับ โดยวิธี Lowry method

นำ homogenate, supernatant หรือ microsome ที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนในแต่ละการทดลองมาเจือจางในน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วเติมสารละลายผสมของ sodium carbonate, copper sulfate, potassium sodium tartrate ทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายเจือจาง folin-ciocalteus ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ ณ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการเทียบปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin

13. การวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST)

นำส่วนไซโตซอลที่เตรียมได้จากข้อ 11 มาทำการวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมของ potassium phosphate-EDTA pH 6.5 และกลูตาไธโอนที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อครบเวลาและเติมสารละลาย 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ทำการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร คำนวณกัมมันตภาพของเอนไซม์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์โมลาร์ (molar extinction coefficient) 9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$ แล้วนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

14. การวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione peroxidase

เติม 10U Glutathione reductase และ2 mM NADPH ลงในหลอดทดลองที่มี reaction mixture แล้วเติม ส่วนไซโตซอลจากตับ ที่เจือจาง 20 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 37 °C นาน 2 นาที เติม t-BHP 10 µl ผสมให้เข้ากัน หากัมมันตภาพของเอนไซม์โดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm

15. การวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ Heme oxygenase

เติมส่วนไมโครโซม ที่ปรับปริมาณโปรตีนเป็น 2.5 mg/ml ลงในPotassium phosphate buffer ที่มี Hemin , Glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, B-NADPH และ Biliverdin reductase เป็นองค์ประกอบ ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 37 °C ในที่มืด นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Chloroform ในที่เย็น นำไป centrifuge 10,000 rpm 4 °C นาน 10 นาที หา Heme oxygenase activity โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460nm และ 530 nm

16. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การหาความแตกต่างของค่าตรวจวัดที่ได้ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มใช้วิธี ANOVA test และ Bonferroni-Dunnet สำหรับ post-hoc test

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย