2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

ใบมะพูด

ใบมะพูดที่นำมาเตรียมสารสกัดทั้งหมด เก็บจากต้นมะพูดซึ่งปลูกอยู่ที่วัดหินเกลี้ยง ต.ท่าข้าม อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

สัตว์ทดลอง

ใช้กระต่ายขาว ตาแดง เพศผู้ อายุ 4 เดือน ซึ่งมีน้ำหนักตัวประมาณ 2.0-2.5 กิโลกรัม กระต่ายแต่ละตัวถูกแยกเลี้ยงในกรงสเตนเลส (stainless steel cage) ขนาด 45 ซม. x 60 ซม. x 45 ซม. ณ หน่วยเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ โดยให้อาหารเม็ด (rabbit chow) ซึ่งผลิตโดยบริษัท ลีพัฒนาผลิตภัณฑ์ จำกัด (มหาชน) ประกอบด้วยโปรตีนไม่น้อยกว่า 16% ไขมันไม่น้อยกว่า 2% กากไม่มากกว่า 13% และความชื้นไม่มากกว่า 13% และมีน้ำดื่มอย่างเพียงพอ (*ad libitum*) กระต่ายทั้งหมดอยู่ภายในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิ $24 \pm 2\ ^{0}$ซ โดยมีแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน รวมจำนวนกระต่ายที่ใช้ตลอดการทดลองทั้งสิ้น 24 ตัว

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade) หรือเทียบเท่า ยกเว้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เตรียมสารสกัดเป็นชนิดคุณภาพห้องปฏิบัติการ (lab grade) แต่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นก่อนนำมาใช้งาน

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
Absolute propyleneglycol	-	Vidhyasom
n-Butyl alcohol (*n*-Butanol)	-	Fluka
Cholesterol from lanolin	386.67	Fluka

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
Formalin	-	Lab Scan
Gelatin	-	Fluka
Glycerol	92.09	Analar®
Harris's hematoxylin	-	Acta
Malonaldehyde bis (dimethyl acetal) (MDA)	164.20	Aldrich
Nembutal® injectable solution(pentobarbitone sodium)	-	Sanofi
Oil Red O	408.5	Sigma
Phenol	94.11	Merck
Sodium sulphate anhydrous Na_2SO_4	142.04	Carlo Erba
Sulfuric acid H_2SO_4	98.08	Lab Scan
Tissue freezing medium for frozen tissue specimens	-	Leica
Thiobarbituric acid (TBA)	144.10	Sigma
Trichloroacetic acid	163.39	Carlo Erba

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น UV160A ของ Shimadzu, Japan
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (refrigerated bench-top centrifuge) รุ่น 5804 R ของ Eppendorf, Germany
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น H10 ของ Mettler, Switzerland
4. เครื่องวัด pH ของสารละลาย (pH-meter) รุ่น PHM61 ของ Radiometer, Denmark
5. เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น PC-410 ของ Corning, USA

6. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของ Scientific Industries, USA
7. เครื่องบดอาหาร รุ่น SK100 ของ F. kurt, Germany
8. เครื่องอัดเม็ดอาหาร (Hobart mixer) รุ่น A-200T ของ Hobart, USA
9. เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (cryostat) รุ่น CM 1850-1-1 ของ Leica, Germany
10. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) รุ่น Super Blender ของ National, Thailand
11. เครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (rotary evaporator) รุ่น RE-120 ของ Buchi, Switzerland
12. กล้องถ่ายภาพจุลทรรศน์แบบดิจิตอล (digital microscope) รุ่น DP11 ของ Olympus, Japan

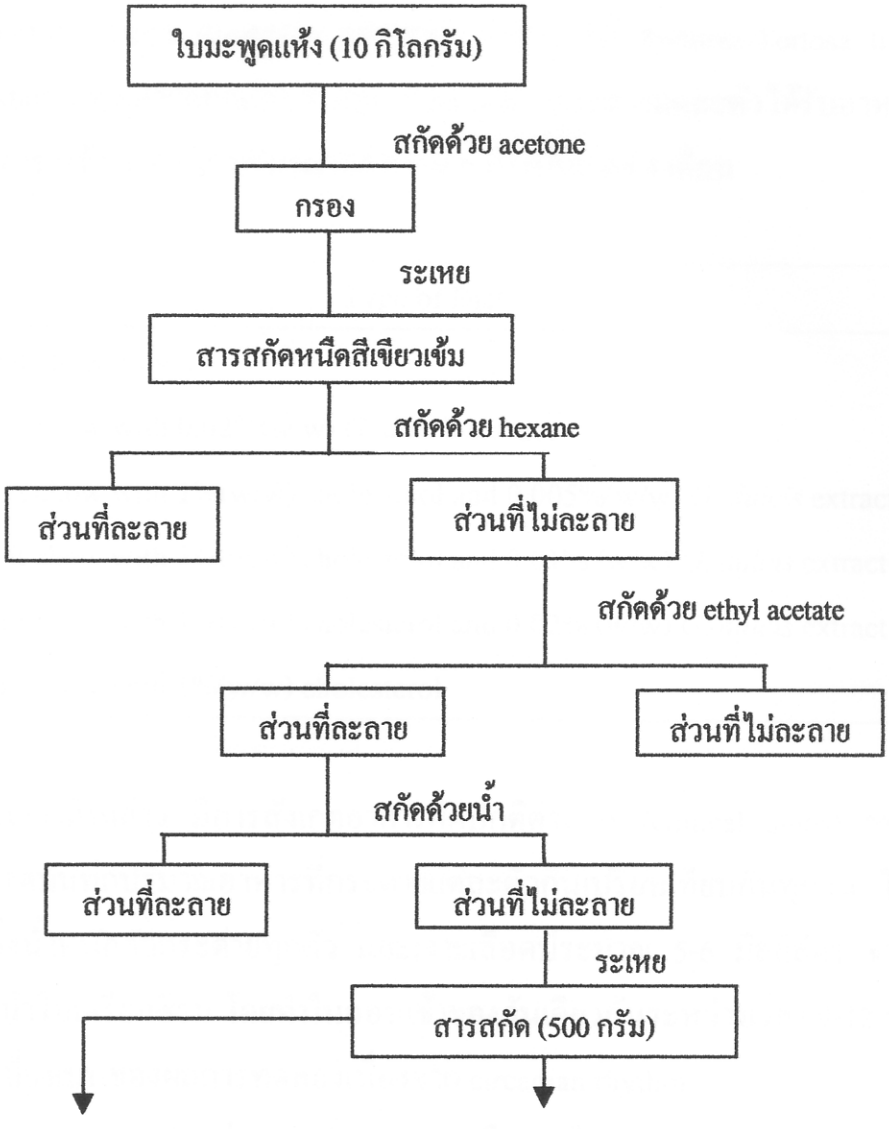
วิธีการ

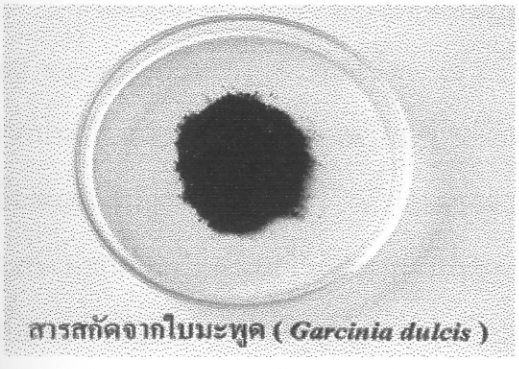
2.1 การเตรียมสารสกัดจากใบมะพูด

ดัดแปลงจากวิธีการของ มยุรี เดชนำบัญชา (2541) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำใบมะพูดมาตากจนแห้งสนิท (ประมาณ 5-7 วัน) จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) นำผงใบมะพูดที่ได้มาห่อด้วยผ้าขาวบางแช่ใน acetone จนท่วมเป็นเวลา 3 วัน ณ อุณหภูมิห้อง กรองส่วนที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) แล้วนำไประเหย acetone ออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (rotatory evaporator) เพื่อลดปริมาตร หลังจากนั้นนำมาสกัดต่อใน hexane นำส่วนตะกอนหนืดสีเขียวเข้มซึ่งไม่ละลายใน hexane มาสกัดต่อใน ethyl acetate แล้วนำส่วนที่ละลายใน ethyl acetate มาผสมกับน้ำ แยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกมา ระเหยจนได้สารสกัดของใบมะพูด (*G. dulcis* extract) ซึ่งมีลักษณะเป็นตะกอนสีเขียวเข้ม นำมาอบให้แห้งแล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา จากนั้นคลุกเคล้ากับอาหารกระต่ายที่บดละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำมาอัดให้เป็นเม็ดด้วยเครื่องอัดเม็ดอาหาร (Hobart mixer)

สรุปขั้นตอนการเตรียมสกัดสารจากใบมะพูด





สารสกัดจากใบมะพูด (*Garcinia dulcis*)

2.2 การทดสอบผลของสารสกัดจากใบมะพูดในกระต่าย

ดัดแปลงจากวิธีการของ Bjorkhem และคณะ (1991) กับ Romirez-Tortosa และคณะ (1999) โดยแบ่งกระต่ายออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว กระต่ายแต่ละตัวได้รับอาหารแต่ละชนิด (ดังตารางข้างล่าง) ในปริมาณ100 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 เดือน

Group	Type of Diet
I	Rabbit chow only
II	Rabbit chow with 0.02%(w/w) *G. dulcis* extract
III	Rabbit chow with 1%(w/w) cholesterol and 0.005%(w/w) *G. dulcis* extract
IV	Rabbit chow with 1%(w/w) cholesterol and 0.01% (w/w) *G. dulcis* extract
V	Rabbit chow with 1%(w/w) cholesterol and 0.02% (w/w) *G. dulcis* extract
VI	Rabbit chow with 1%(w/w) cholesterol

ตลอดระยะเวลาดังกล่าว มีการสังเกตอาการผิดปกติต่าง ๆ (clinical signs) ของกระต่าย และจดบันทึกปริมาณอาหารที่กระต่ายแต่ละตัวกินเปรียบเทียบกันทุกวัน ในทุก ๆ เดือน ชั่งน้ำหนักตัวกระต่ายทุกตัว และเจาะเลือดประมาณ 5-6 มิลลิลิตร จากบริเวณใบหูเพื่อนำไปเตรียมซีรัม โดยทำในตอนเช้าของวันเดียวกันระหว่างเวลา 9-12 น. เพื่อป้องกันการเบี่ยงเบนของผลการทดลองเนื่องจาก circadian rhythm

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กระต่ายอายุประมาณ 8 เดือน) ฉีด pentobarbitone sodium (60 mg/ml) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เข้าเส้นเลือดดำบริเวณใบหูกระต่ายให้ตายอย่างสงบ จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเตรียมเป็นซีรัมเก็บไว้ ทำการผ่าตัดกระต่าย เพื่อแยกหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ออกจากหัวใจตั้งแต่ตรงฐาน aortic arch, thoracic aorta และ abdominal aorta ออกมาเพื่อเตรียมไว้ศึกษาการเกิด atherosclerotic plaques และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของผนังหลอดเลือดบริเวณดังกล่าวต่อไป

กำจัดซากกระต่ายทั้งหมดที่ได้จากการทดลองนี้ โดยเผาตามขั้นตอนของหน่วยเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์

2.3 การเตรียมซีรัมกระต่าย

นำตัวอย่างเลือดที่เพิ่งเจาะจากหลอดเลือดดำบริเวณใบหูกระต่าย ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น 5804 R ของ Eppendorf โดยใช้โรเตอร์ (rotor) แบบ swing-bucket ชนิด A-4-44 ในอัตราเร็ว 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บซีรัมซึ่งเป็นของเหลวสีเหลืองใสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงเลือดดังกล่าว ไว้ที่อุณหภูมิ -10 °ซ สำหรับหาปริมาณคอเลสเทอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ MDA ต่อไป

2.4 การหาปริมาณคอเลสเทอรอล

ตรวจหาปริมาณคอเลสเทอรอลในซีรัม ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ CTP Diagnostic, Spain ซึ่งอาศัยหลักการใช้เอนไซม์ cholesterol oxidase ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างโดยไม่ต้องสกัดแยกคอเลสเทอรอลออกมาก่อน เปลี่ยนคอเลสเทอรอลให้เป็น cholestenone และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ peroxidase เมื่อมี 4-aminoantipyrine และ phenol อยู่ด้วย ได้เป็นน้ำและสารประกอบ quinoneimine ที่มีสีชมพู ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ดังสมการข้างล่าง

$$\text{cholesterol ester} + H_2O \xrightarrow{\text{cholesterol esterase}} \text{cholesterol} + \text{fatty acid}$$

$$\text{cholesterol} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{cholesterol oxidase}} \text{cholestenone} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{4-aminoantipyrine} + \text{phenol} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{quinoneimine} + 4\,H_2O$$

นำตัวอย่างซีรัมปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาเติมน้ำยาทดสอบ (reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 4-aminoantipyrine, peroxidase, cholesterol oxidase, cholesterol esterase, phenol และ sodium cholate ใน 35 mM Pipes buffer ที่ pH 7.0 ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (แต่ละตัวทำซ้ำ 3 ครั้ง) เปรียบเทียบกับสารละลาย

มาตรฐานคอเลสเทอรอล ซึ่งมีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นของคอเลสเทอรอลในซีรัมตัวอย่างโดยใช้สูตรดังนี้

$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงสารละลายตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงสารละลายมาตรฐาน}} \times \text{ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน} = \text{ความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง}$$

2.5 การหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์

ตรวจหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในซีรัม ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ CTP Diagnostic, Spain โดยอาศัยปฏิกิริยา ดังสมการข้างล่าง

$$\text{triglycerides} + H_2O \xrightarrow{\text{lipase}} \text{glycerol} + \text{fatty acid}$$

$$\text{glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{glycerol kinase}} \text{glycerol-3-phosphate (G-3-P)} + \text{ADP}$$

$$\text{G-3-P} + O_2 \xrightarrow{\text{G - 3 - P oxidase}} \text{dihydroxyacetone phosphate} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-aminoantipyrine} + \text{4-chlorophenol} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{quinoneimine} + 4\ H_2O$$

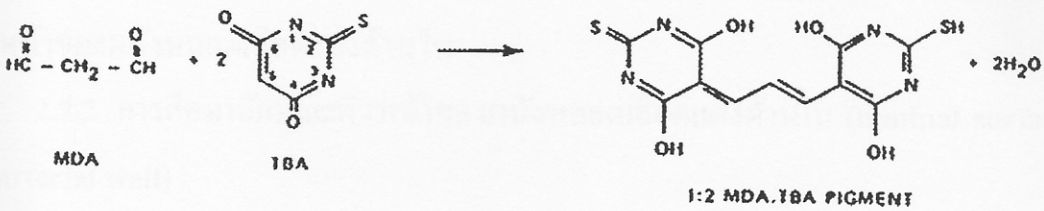
ในปฏิกิริยาดังกล่าว เอนไซม์ lipase จะย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์แล้วให้ glycerol จากนั้นเอนไซม์ glycerol kinase จะเปลี่ยน glycerol ให้เป็น glycerol-3-phosphate และใช้เอนไซม์ glycerol-3-phosphate oxidase ย่อย glycerol-3-phosphate ให้ dihydroxyacetone phosphate และ H_2O_2 ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ 4-chlorophenol และ 4–aminoantipyrine เมื่อมีเอนไซม์ peroxidase อยู่ด้วยให้ quinoneimine ที่ดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร

นำตัวอย่างซีรัมปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาเติมน้ำยาทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 4-aminoantipyrine, adenosine triphosphate (ATP), lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase, peroxidase, 4-chlorophenol และ $MgCl_2$ ใน 45 mM Pipes buffer ที่ pH 7.0 ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (แต่ละตัวทำซ้ำ 3 ครั้ง) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งมีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ในซีรัมตัวอย่างโดยใช้สูตรเช่นเดียวกับการหาปริมาณคอเลสเทอรอล

2.6 การหาปริมาณ MDA ในตัวอย่างซีรัม

ดัดแปลงจากวิธีของ Satoh (1978) ซึ่งอาศัยหลักการคือ เมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระจะสลายตัวได้สารประกอบ MDA กับอนุพันธ์ต่าง ๆ ของ MDA (MDA like substances) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) จะได้น้ำและสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพู เกิดขึ้น ดังแสดงข้างล่าง



รูปที่ 6 ปฏิกิริยาระหว่าง MDA กับ TBA (Coudray *et al.*, 1991)

นำตัวอย่างซีรัมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย 20% (w/v) trichloroacetic acid ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น 5804 R ของ Eppendorf โดยใช้ โรเตอร์แบบ swing-bucket ด้วยอัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วย 50 mM H_2SO_4 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม 50 mM H_2SO_4 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรอีกครั้งพร้อมกับเติม 0.2% TBA ใน 2 M Na_2SO_4 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำไปแช่ในน้ำเย็น แล้วนำมาสกัดด้วย *n*-butanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร โดยการเขย่าอย่างแรง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงในอัตราเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic phase) มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

530 นาโนเมตร (แต่ละตัวทำซ้ำ 3 ครั้ง) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมขึ้นโดยใช้สารละลาย MDA ความเข้มข้นต่าง ๆ กันใน 50 mM H_2SO_4

2.7 การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของหลอดเลือดแดงกระต่าย

2.7.1 การดองตัวอย่าง (fixation)

นำหลอดเลือดแดงที่ได้แยกออกจากหัวใจ มาแช่ใน 10% (v/v) formalin ทิ้งไว้ 2-3 วัน ก่อนทำการศึกษา

จากตัวอย่างหลอดเลือดแดงที่แช่ใน 10% formalin นำมาตัดเป็น 2 ส่วนโดยส่วนแรก ตัดจากจุดเริ่มต้นตรงฐานที่ออกจากหัวใจ ยาว 1 ซม. ไว้เพื่อศึกษาโครงสร้างภายในหลอดเลือดแดง ส่วนที่ 2 ตัดตรงบริเวณของ thoracic aorta ไว้เพื่อศึกษาลักษณะผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงด้านใน

2.7.2 การศึกษาลักษณะผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงด้านใน (luminal surface of arterial wall)

นำชิ้นเนื้อที่เตรียมไว้มาตัดตามยาวโดยแยกรอยตัดออกเพื่อดูผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงด้านใน และตรวจสอบความถี่ของจำนวนการเกิด plaque บนผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงบริเวณด้านในของท่อ

2.7.3 การศึกษาโครงสร้างภายในของหลอดเลือดแดง

2.7.3.1 การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อ

นำชิ้นเนื้อที่เตรียมไว้มาวางบนแท่นวางเนื้อเยื่อ แล้วเคลือบด้วยตัวกลาง (tissue freezing medium) จนท่วมชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (cryostat) ตัดให้ได้ความหนาประมาณ 10–15 ไมโครเมตร นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ (cryosection) มาติดบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วยสารเคลือบสไลด์ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทิ้งไว้ประมาณ 10–15 นาที เพื่อให้ชิ้นเนื้อเยื่อติดสไลด์ได้ดียิ่งขึ้น แล้วจึงนำไปผ่านกระบวนการย้อมสี (staining) ต่อไป

2.7.3.2 กระบวนการย้อมสี (Humason, 1979; เวคิน นพนิตย์, 2524)

ล้างชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ใน absolute propyleneglycol เป็นเวลา 2 นาที แล้วย้อมด้วยสี Oil Red O (Oil Red O ปริมาณ 0.5 กรัม ละลายใน propyleneglycol 100 มิลลิลิตร) นาน 20-30 นาที ตามด้วยการแช่ใน 85% (v/v) propyleneglycol อีกประมาณ 1 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ก่อนย้อมด้วยสี Harris's hematoxylin นาน 5-10 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำ gelatin jelly (gelatin ปริมาณ 10 กรัม ในสารละลายผสมของ glycerin 70 มิลลิลิตร phenol 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร) มาเคลือบบนตัวอย่าง ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) นำสไลด์ที่ย้อมได้ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดิจิตอลเพื่อบันทึกภาพและวัดความหนาของชั้นผนังหลอดเลือดแดง โดยเทียบมาตราส่วนกับแท่นมาตราส่วนความยาว 1 มิลลิเมตร ภายใต้กำลังขยายเดียวกัน (เตรียมสไลด์จำนวน 5 แผ่นสำหรับกระต่ายแต่ละตัว และบนสไลด์แต่ละแผ่นวัดความหนาของ plaque บนชิ้นเนื้อเยื่อ ทั้งหมด 2 บริเวณ แล้วหาค่าเฉลี่ย)

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้แสดงค่าในรูปของ Mean ± S.D. และนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ oneway ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (95% confidential) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window 10 (SPSS Inc., USA.) จากนั้นจึงใช้ Scheffe's test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง