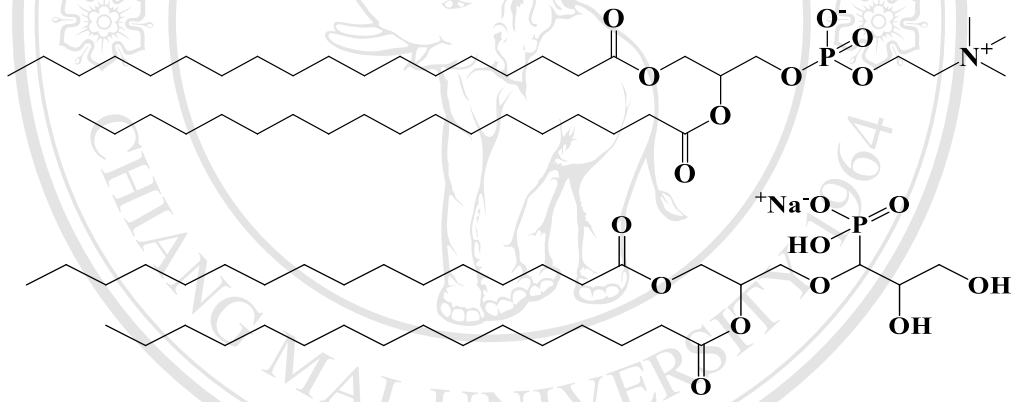
บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การสังเคราะห์ถุงไขมันบรรจุแก๊ส

การสังเคราะห์ถุงไขมันบรรจุแก๊สใช้ฟอสโฟไลปิด 2 ชนิด ได้แก่ Phosphatidylcholine (PC) และ 1,2- Dipalmitoyl-sn-glyero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (PG) ซึ่งฟอสโฟไลปิดทั้งสอง มีค่า Tm เท่ากับ 41°C โดยมีโครงสร้างเคมี ดังภาพที่ 9 และในกระบวนการสังเคราะห์เลือกใช้เทคนิค Freeze thaw โดยมีขั้นตอนการสังเคราะห์ถุงไขมันบรรจุแก๊ส ดังนี้



ภาพที่ 9 โครงสร้างเคมีของ Phosphatidylcholine, PC (บน) และ 1,2- Dipalmitoyl-sn-glyero-3-phospho-rac-(1-glycerol), PG (ล่าง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.1 การทำแผ่นฟิล์มบาง

ขั้นตอนการทำแผ่นฟิล์มบาง (thin film) เป็นกระบวนการจัดเรียงโมเลกุลฟอสโฟไลปิดทั้งสองชนิด ให้เรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ภายใต้อุณหภูมิและความดันที่เหมาะสม กล่าวคือ ใช้อุณหภูมิที่ไม่ทำให้โมเลกุลฟอสโฟไลปิดมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง คุณสมบัติทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพ และปรับความดันให้เหมาะสมกับตัวทำละลายที่ใช้ เพื่อแยกตัวทำละลายออกจากโมเลกุลที่ศึกษา โดยใช้เครื่องมือ Rotary vacuum evaporator มีขั้นตอนดังนี้

1) ละลาย PC และ PG ในอัตราส่วนโดยโมล 1:1, 5:1 และ 10:1 ด้วยตัวทำละลายไตรคลอโรมีเทน (organic phase) ใน Evaporation flask
2) เปิดเครื่องมือ Rotary vacuum evaporator (Büchi Certificate Final Test Inspection, Rotavapor R-210/215, Heating Bath B-411, Vacuum Line V-700, Flawil, Switserland) ตั้งอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C ตั้งความดัน 296 mbar และเปิดระบบหล่อเย็น (water circulation system) ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้ตัวทำละลายที่ระเหยเป็นไอควบแน่นกลายเป็นของเหลว
3) นำ Evaporation flask ที่บรรจุสารละลายฟอสโฟไลปิดที่เตรียมไว้ต่อเข้ากับเครื่องมือ Rotary vacuum evaporator และเลื่อนสารละลายใน Evaporation flask ลงจุ่มในอ่างปรับอุณหภูมิ
4) ทำการกลั่น โดยหมุน Evaporation flask ด้วยความเร็ว 84 rpm กระทั่งไม่มีของเหลวเหลืออยู่ใน Evaporation flask
5) จะได้แผ่นฟิล์มบางฟอสโฟไลปิดชนิด PC:PG ในอัตราส่วนต่างๆ

3.1.2 การสร้างถุงไขมันบรรจุแก๊สด้วยเทคนิค Freeze thaw

การละลายแผ่นฟิล์มบางฟอสโฟไลปิดชนิด PC:PG ออกจากผิว Evaporation flask ทำได้โดยใช้สารละลายวัฏภาคที่เป็นน้ำ (aqueous phase) ร่วมกับใช้เทคนิค Freeze thaw เพื่อให้แผ่นฟิล์มบางเกิดการรวมตัวแบบสุ่มกลายเป็นถุงไขมัน มีขั้นตอนดังนี้

1) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.01 mM Tris–HCl pH=7.4 ลงในแผ่นฟิล์มบาง ภายใน Evaporation flask
2) จุ่ม Evaporation flask ลงในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 35–37°C นาน 2 Min.
3) จุ่ม Evaporation flask ลงในอ่างน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 Min.
4) ผ่านแก๊สไนโตรเจนลงในสารละลาย (nitrogen blow) ภายใน Evaporation flask นาน 2 Min.
5) ทำการให้ความร้อน ความเย็น และแก๊สไนโตรเจน อย่างละ 2 Min. ตามลำดับจำนวน 9 รอบ
6) ได้สารละลายที่มีถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG ในอัตราส่วนต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 การทำให้ขนาดของถุงไขมันใกล้เคียงกัน (homogeneous) ด้วยเทคนิค Sonicate

การสังเคราะห์ถุงไขมันบรรจุแก๊สด้วยเทคนิค Freeze thaw ถุงไขมันที่ได้จะมีขนาดแตกต่างกัน (heterogeneous) เทคนิค Sonicate คือการให้คลื่นเสียงความถี่สูงแก่สารตัวอย่าง สามารถทำให้ถุงไขมันมีขนาดใกล้เคียงกัน (homogeneous) [18] มีขั้นตอนดังนี้

1) ตั้งความถี่ Sonicator probe ชนิดเข็ม (Sonicator UP50H, Hielscher Ultrasonics GmbH., Germany) เท่ากับ 30 kHz (50 w, amplitude 100%, pulse 100%)
2) ให้ความถี่แก่สารละลายถุงไขมันบรรจุแก๊ส เป็นเวลา 5 Min.
3) ทำการให้ความร้อน และความเย็น ตามลำดับ จำนวน 1 รอบ
4) จะได้สารละลายที่มีถุงไขมันบรรจุแก๊ส ชนิด PC:PG ในอัตราส่วนต่างๆ และเก็บรักษาถุงไขมันบรรจุแก๊สในที่มืด อุณหภูมิ 37°C

3.2 การตรวจสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของถุงไขมันบรรจุแก๊ส

คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของถุงไขมันบรรจุแก๊สที่ศึกษา ได้แก่ ขนาด และค่า Zeta-potential โดยใช้วิธีโฟลไซโตมิตรี (flow cytometry) และ Dynamic Light Scattering (DLS)

3.2.1 การวัดขนาดด้วยเทคนิค Flow cytometry

วัดขนาดอนุภาคที่ทราบค่า (standard size) เพื่อสร้าง standard curve คือกราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคที่ทราบค่า กับค่าการกระเจิงของแสง (Scatter) ที่วัดได้จากเครื่องมือ Flow cytometer และนำมาเทียบหาขนาดถุงไขมันบรรจุแก๊ส มีขั้นตอนดังนี้

1) วัดค่าการกระเจิงของแสง ของอนุภาคที่ทราบค่า (standard size) คือ 0.5, 1.0 และ 6.0 μm
2) วัดค่าค่าการกระเจิงของแสง ของถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG อัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1:1, 5:1 และ 10:1
3) หาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาค กับค่าการกระเจิงของแสง เพื่อสร้าง standard curve และคำนวณหาขนาดของถุงไขมันบรรจุแก๊ส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

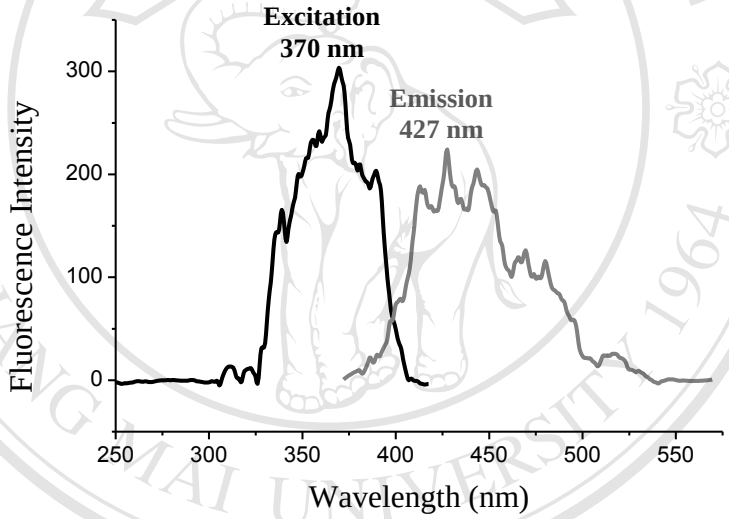
3.2.2 การวัดขนาดด้วยเทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS)

1) เจือจางถุงไขมัน 100 μL ใน 0.01 mM Tris–HCl pH=7.4 ปริมาตร 1 mL ก่อนทำการวัดค่าขนาด และค่า Zeta-potential ของถุงไขมันบรรจุแก๊ส และทำการวัดค่าที่อุณหภูมิ 25°C

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ถุงไขมันบรรจุแก๊ส

3.3.1 การตรวจสอบการเป็นถุงไขมัน และความเสถียรของถุงไขมัน ด้วยเทคนิค Spectrofluorometry

การพิสูจน์เอกลักษณ์ที่แสดงการเป็นถุงด้วยเทคนิค Spectrofluorometry สามารถใช้พิสูจน์ลักษณะถุงไขมันบรรจุแก๊สโดยใช้ 1,6-diphenyl-1-3,5-hexatriene (DPH) ซึ่งมีคุณสมบัติของการเรืองแสงเมื่อเข้าไปเรียงแทรกระหว่างโมเลกุลไขมันที่มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบในบริเวณที่ไม่มีขั้วของฟอสโฟไลปิด ซึ่งสามารถวัดการเรืองแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 427 nm เมื่อกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 370 nm ดังภาพที่ 10 ดังนั้นปริมาณการเรืองแสงของ DPH แปรผันตามปริมาณถุงไขมันที่สังเคราะห์ขึ้นที่มีลักษณะของการเรียงตัวเป็นชั้นอย่างเป็นระเบียบ

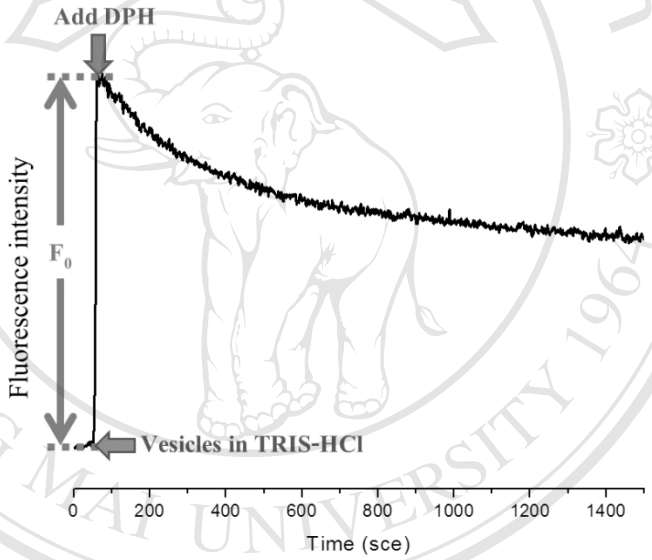


ภาพที่ 10 กราฟการกระตุ้น (excitation spectrum) และการเรืองแสง (emission spectrum) ของ DPH เมื่อเข้าไปแทรกส่วนไม่มีขั้วของฟอสโฟไลปิดบนผิวถุงไขมันชนิด PC:PG ในตัวทำละลาย Tris-HCl pH=7.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากหลักการพิสูจน์เอกลักษณ์การเป็นถุงไขมันบรรจุแก๊สข้างต้น นำมาใช้ตรวจสอบความเสถียรของถุงไขมันบรรจุแก๊ส โดยทำการวัดค่า Fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไป ดังภาพที่ 11 กล่าวคือการเรืองแสงของ DPH แสดงลักษณะของถุงไขมันบรรจุแก๊สที่มีการเรียงตัวของฟอสโฟไลปิด 2 ชั้น (bilayers) โดยการเรืองแสงดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณถุงไขมันบรรจุแก๊ส และรูปแบบการจัดเรียงตัวของฟอสโฟลิดบนผิวถุงไขมัน มีขั้นตอนดังนี้

1) เจือจางถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG 10 μL ด้วย 0.01 mM Tris–HCl pH=7.4 ปริมาตร 2 mL ลงใน cuvette ตามด้วยแท่งแม่เหล็กอย่างสม่ำเสมอ
2) ติดตามการเรืองแสงของ DPH ที่ความยาวคลื่น 427 nm เมื่อกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 370 nm ใช้ Time drive mode ด้วยเครื่องมือ Spectrofluorometer (Perkin Elmer LS55) เวลา 2 Min.
3) เติมสารติดตามเรืองแสง DPH 0.1 mM ปริมาณ 2 μL (final concentration 10^{-7} M) แล้วติดตามการเรืองแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 25–30 Min.
4) ทำการวัดถุงไขมันบรรจุแก๊สในอัตราส่วนต่างๆ เมื่อเก็บถุงไขมันบรรจุแก๊สที่อุณหภูมิ 37°C ตั้งแต่หลังทำการสังเคราะห์ถุงไขมันบรรจุแก๊ส จนถึง 21 วันหลังการสังเคราะห์ถุงไขมันบรรจุแก๊ส



ภาพที่ 11 การเรืองแสงของถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG ในตัวทำละลาย Tris-HCl pH=7.4 เมื่อเติมสารเรืองแสง DPH และผลต่างของค่าการเรืองแสง Fluorescence intensity, F_0

3.3.2 การตรวจสอบการเป็นถุงไขมันด้วยเทคนิค Spectrophotometry

หลังจากได้ผลการทดสอบความเสถียร และทราบขนาดของถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG ในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1:1, 5:1 และ 10:1 ทำการเลือกถุงไขมันบรรจุแก๊ส ที่มีความเหมาะสม เพื่อทำการปรับแต่งผิวถุงไขมันด้วยโมเลกุลฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$)

คุณสมบัติการดูดกลืนพลังงานแสงที่แตกต่างกันของโมเลกุลต่างชนิดกัน เมื่อวัดด้วยเทคนิค Spectrophotometry สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของถุงไขมันบรรจุแก๊สได้ คือถุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไขมันชนิดฟอสโฟไลปิด มีแถบการดูดกลืนพลังงานแสงในช่วง (characteristic curve) ที่ 230–300 nm [28] จากการวัดคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของถุงไขมันชนิด PC:PG อัตราส่วน 1:1 ในตัวทำละลาย Tris-HCl pH=7.4 พบว่ามีการดูดกลืนพลังงานแสงสูงสุดที่ 240 nm และเมื่อวัดคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ในตัวทำละลาย Tris-HCl pH=7.4 พบว่ามีการดูดกลืนพลังงานแสงสูงสุดที่ 304 nm ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่ 304 nm จึงใช้เป็นคุณลักษณะของถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG:$FeCl_3$ อัตราส่วน 1:1:1 มีขั้นตอนดังนี้

1) เจือจาง $FeCl_3$ ด้วย 0.01 mM Tris-HCl pH=7.4 ปริมาตร 2 mL ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25 mM ลงใน cuvette (ปริมาณ $FeCl_3$ ก่อนการสร้างถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG: $FeCl_3$ อัตราส่วน 1:1:1)
2) วัดคุณสมบัติการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือ Spectrophotometer (Agilent 8453)
3) หลังการสร้างถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG:$FeCl_3$ อัตราส่วน 1:1:1 ทำการวัดคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารละลาย Tris-HCl ที่เหลือจากการสร้าง
4) วัดคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG อัตราส่วน 1:1 และชนิด PC:PG: $FeCl_3$ อัตราส่วน 1:1:1

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เป็นการทดสอบความเป็นพิษของถุงไขมันที่สังเคราะห์ขึ้นต่อเซลล์ โดยเลือกใช้เซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไวต่อยา doxorubicin (GLC4) และเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ดื้อต่อยา doxorubicin (GLC4/Adr) เป็นตัวแทนเซลล์ในการทดสอบ มีขั้นตอนดังนี้

1) เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่เติม 10% (v/v) fetal calf serum และ 5% (v/v) penicillin-streptomycin ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณความชื้น 95% และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 72 Hrs. ก่อนนำมาทดสอบความเป็นพิษของถุงไขมันบรรจุแก๊ส
2) นำเซลล์จำนวน 50,000 cells/mL ของอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มรวมกับถุงไขมันบรรจุแก๊สจากความเข้มข้น 0.12–10 μM เป็นเวลา 72 Hrs.
3) เมื่อครบเวลา 72 Hrs. นำเซลล์ที่บ่มกับถุงไขมันบรรจุแก๊สมานับด้วยเครื่องมือ Flowcytometer (Beckman coulter, Miami, FL, USA)
4) นำจำนวนเซลล์ที่นับวัด มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ โดยเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับการบ่มกับถุงไขมันบรรจุแก๊ส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การทำอันตรกิริยาของถุงไขมันบรรจุแก๊สต่อเซลล์มะเร็ง

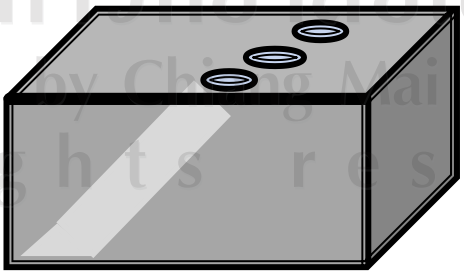
การศึกษาอันตรกิริยาของถุงไขมันบรรจุแก๊สต่อเซลล์ เลือกศึกษากับเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไวต่อยา doxorubicin (GLC4) มีขั้นตอนดังนี้

1) ทำการเลี้ยงเซลล์ 50,000 cells/ 2 mL ของอาหารเลี้ยงเซลล์ ในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 cm เป็นเวลา 24 Hrs. เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับพื้นผิวของจานเลี้ยงเซลล์
2) ก่อนทำการศึกษาดังกล่าวทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline solution, PBS) 2 รอบ และรักษาสภาพเซลล์ด้วย PBS 1 mL
3) สังเกตดูพฤติกรรมของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง (Leica DMI 400B, Germany) ที่ติดกับกล้องวีดีโอ (Fujiko super low lux 550 TVL, Japan)
4) ดูการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ก่อน และหลังเติมถุงไขมันบรรจุแก๊สที่เติม DPH ลงไป

3.6 การสร้างภาพถุงไขมันบรรจุแก๊ส

การสร้างภาพถุงไขมันบรรจุแก๊สด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวด์) สามารถบอกถึงอันตรกิริยาการสะท้อนกลับของคลื่นเสียงความถี่สูงได้ มีขั้นตอนดังนี้

1) สร้างหุ่นจำลองชนิดเจลอาการ์ (10 mg/mL) โดยหุ่นจำลองเพื่อใช้สร้างภาพมีช่องขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4–5 mm จำนวน 3 ช่อง เพื่อใช้ใส่สารตัวอย่าง ร่วมกับการสร้างภาพด้วยอัลตร้าซาวด์ ดังภาพที่ 12
2) สร้างภาพอัลตร้าซาวด์ด้วย B–mode ใช้หัวตรวจชนิดตรง (linear probe) ความถี่ 8 MHz ของอากาศ น้ำ และถุงไขมันบรรจุแก๊ส เป็นต้น



ภาพที่ 12 ภาพแสดงหุ่นจำลองเพื่อใช้สร้างภาพอัลตราซาวด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 การตรวจสอบผลของคลื่นเสียงความถี่สูงต่อถุงไขมันบรรจุแก๊ส

คลื่นเสียงความถี่สูงสามารถกระตุ้นให้ตัวกลางที่เป็นฟองอากาศ หรืออยู่ในรูปของถุงไขมันเกิดการแตก หรือเสียสภาพได้ จึงทำการศึกษาความเสถียรของถุงไขมันบรรจุแก๊สชนิด PC:PG อัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1:1 และ PC:PG:$FeCl_3$ อัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1:1:1 ต่อคลื่นเสียงความถี่สูงที่ความถี่ต่างๆ มีขั้นตอนดังนี้

1) เจือจางถุงไขมันบรรจุแก๊ส 40 μL ด้วย 0.01 mM Tris-HCl pH=7.4 ปริมาตร 8 mL ลงในถุงเพื่อให้คลื่นเสียงความถี่สูง
2) ให้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ความถี่ 0.8 MHz เป็นเวลา 10 Min.
3) เก็บตัวอย่าง เพื่อทำการติดตามการเรืองแสงของ DPH ที่ความยาวคลื่น 427 nm เมื่อกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 370 nm เช่นเดียวกับการตรวจสอบการเป็นถุงไขมันและความเสถียรของถุงไขมัน ด้วยเทคนิค Spectrofluorometry (ข้อ 3.3.1)
4) เพิ่มเวลาการให้คลื่นเสียงความถี่สูง เป็น 30 และ 60 Min.
5) เก็บตัวอย่าง เพื่อทำการติดตามการเรืองแสงเช่นเดียวกัน
6) เปลี่ยนการให้คลื่นเสียงความถี่สูง เป็นความถี่ 2.4 8.0 และ 12.0 MHz ตามลำดับ
7) เก็บตัวอย่าง เพื่อทำการติดตามการเรืองแสงของ DPH เมื่อให้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 10 30 และ 60 Min. เช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved