บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

การทดลองใน Isolated Rat Hepatocytes

ใช้หนูขาวเพศผู้ พันธุ์ wistar rat น้ำหนักประมาณ 250 - 300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองใน Mitochondria

ใช้หนูขาวเพศผู้ พันธุ์ wistar rat น้ำหนักประมาณ 180 - 200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารเคมีและเครื่องมือ

สารที่ทดลองศึกษา คือ xanthones สกัดจากภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

บริษัท คลินิคอลไดแอคโนสติคส์ ประเทศไทย

SGOT & SGPT sets

บริษัท อี เมอร์ค ประเทศเยอรมันนี

Diethyether

Hydrochloric acid

Potassium hydroxide

Sodium carbonate

บริษัท ลีโอ ฟาร์มาซูติคอล ประเทศเดนมาร์ค

Heparin 5,000 IU/ml

บริษัท ซิกมาเคมีคอล ประเทศสหรัฐอเมริกา

Bovine serum albumin

Calcium chloride

Collagenase (type IV)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

DNP

EGTA

Folin - Ciocalteu Phenol reagent

L - glutamine

L - glutamic acid

Magnesium sulfate

Malic acid

Minimum Essential Medium Eagle (MEM)

Potassium chloride

Sodium bicarbonate

Sodium chloride

Succinic acid

Sucrose

Sulfosalisylic acid

Trypan blue solution 0.4 %

บริษัท ไทยอินดัสเตรียลแก๊ส

Carbogen gas

เครื่องมือที่ใช้

Autopipets 10 - 5000 microlit (Pipetman, Gilson Medical Electronic, France)

Centrifuge (H - 103N, Kokusan Enskinki So., Ltd.,Japan)

Counting chamber (Neubauer, bright - line)

Dissecting instuments

Dispossible insulin syring with needle

Glasswares

Ice bath

Light microscope

Liver perfusion apparatus

Magnetic stirrer with magnetic bar (S - 8252 - 1,American)

Metabolic shaker bath (Maxi - shake, Heto, Denmark)

Microtube pump (501 S, Watson - Marlow Ltd., England)

Operation table

pH meter (Beckman Instruments, USA)

Sonicator

Spectrophotometer (Ultaspec II, LKB Biochrome Ltd., England)

Vortex mixer (Clay adams, USA)

Water bath (Hetofrig, Heto, Denmark)

3. การเตรียมสารที่ใช้ในการศึกษาและการตรวจสอบ

การเตรียม xanthones

xanthones ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แบ่งเป็น

1. xanthones ที่ใช้ในการศึกษา *in vitro* ในการทดลองของ Isolated Rat Hepatocytes และ ในการทดลองของ Mitochondria จะละลายใน DMSO (Dimethyl sulfoxide)

2. xanthones ที่ใช้ในการศึกษา *in vivo* จะละลายใน Tween (tween : H_2O : alcohol = 5 : 90 : 5) ในความเข้มข้น 100 mg ต่อหนูหนัก 1 kg

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาว

การเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาวใช้วิธีของ Berry และ Friend (1969) ซึ่งปรับปรุงโดย Stacey และ Priestly (1978) แต่เปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมกับอุปกรณ์ที่มีอยู่ใช้ Modified Kreb's and Henseleit Physiological solution ซึ่งให้ carbogen gas และอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตลอดเวลาดังนี้

1. สารละลาย A : calcium free medium (Ca^{2+} free buffer) ประกอบด้วย

NaCl	96 mM
KCl	1.4 mM
$MgSO_4.7H_2O$	0.7 mM
KH_2PO_4	2.5 mM
$NaHCO_3$	2.5 mM
Sodium gluconate	21.7 mM

(equilibrate with carbogen gas , pH 7.4)

2. สารละลาย B : Collagenase buffer

collagenase type IV 0.08 % ในสารละลาย A ปริมาตร 30 ml และ 10 ml

3. สารละลาย C : Washing medium ประกอบด้วย

3.1 $CaCl_2.2H_2O$ 1.26 mM ในสารละลาย A ปริมาตร 150 ml

3.2 เติม BSA 1.2 % ในสารละลายข้อ 3.1 ในปริมาตร 100 ml และ 30 ml

4. สารละลาย D : Incubation medium (Eagle's Basal Medium) 100 ml ประกอบด้วย

MEM 10 %	10.0 ml
L-glutamine (200 mM)	1.0 ml
BSA 1.2 %	1.2 g

ละลายในน้ำกลั่น 80 ml จากนั้นค่อย ๆ ปรับ pH ด้วย $NaHCO_3$ (2.8 % w/v) ซึ่งละลาย ในน้ำกลั่น 10.0 ml จนได้ pH 7.4 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ 100.0 ml

การเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาว (Preparation of Isolated Rat Hepatocytes) มีขั้นตอนดังนี้

1. ผ่าตัดเพื่อสอดแคนูลาเข้าสู่ portal vein ของหนูขาว ภายใต้การดมสลบด้วย ether

2. Two-steps perfusion : ปล่อย calcium free medium ไหลผ่านตับแบบไหลทิ้ง (nonrecirculating perfusion) ตัดตับออกจากตัวหนูแล้วใช้น้ำยา collagenase buffer ไหลผ่านตับแบบไหลเวียนซ้ำ (recirculating perfusion) เป็นเวลา 10 นาที

3. Disruption of collagenase - perfused liver : แกว่งให้เซลล์ตับหลุดเป็นอิสระใน collagenase buffer นำไปใส่ใน erlenmeyer flask (250 ml) ซึ่งให้ carbogen gas ตลอดเวลา เขย่าใน metabolic shaker bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านผ้ากรองไนล่อน 2 ครั้ง

4. Purification of parenchymal cells : ปั่นแยก parenchymal cells แล้วล้างแขวนลอยเซลล์ใน washing medium 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ครั้งละ 30 วินาที เซลล์แขวนลอยขั้นสุดท้ายจะอยู่ใน incubation medium

5. Trypan blue exclusion test : ผสมเซลล์แขวนลอย 50 µl กับน้ำยา 0.4 % trypan blue 50 µl แล้วนับจำนวนเซลล์ใน counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

$$\% \text{ Trypan blue exclusion} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เป็น}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

เซลล์ตับอิสระที่มีค่า Trypan blue exclusion เกิน 86 % เท่านั้นจึงจะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

6. Incubation of Isolated Hepatocyte Suspension : ในทุกการทดลองจะใช้เซลล์ตับอิสระแขวนลอย ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง incubate ใน erlenmeyer flasks ขนาด 25 มิลลิลิตร โดยให้ carbogen ตลอดเวลา เขย่าใน metabolic shaker bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7. การหาน้ำหนักเปียกของเซลล์ตับ (Wet weight) : ผลของค่าวัดส่วนใหญ่ จะคำนวณต่อหน่วย wet weight นำเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่ทราบน้ำหนัก (2 ตัวอย่าง) ไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวลอยตัว (supernatant) ทิ้งแล้วคว่ำหลอดทดลองเป็นเวลา 2 ชั่วโมงนำไปชั่งหาน้ำหนักเฉลี่ย ($\bar{}$ mg ml^{-1})

วิธีการตรวจวัด

1. การตรวจวัดระดับ Reduced Glutathione (GSH) (Ellman, 1959 ปรับปรุงโดย Jollow, 1974)

1.1 นำเซลล์ตับอิสระที่แยกได้ตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 4 % sulfosalicylic acid 0.5 มิลลิลิตร ปั่นแยกของเหลวลอยตัว 0.5 มิลลิลิตร

1.2 เติมสารละลาย 0.1 mM dithiobenzoic acid (ใน 0.1 M phosphate buffer pH 8) ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร

1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ GSH คำนวณจากค่า extinction coefficient (1.36×10^{-2} $M^{-1} cm^{-1}$)

2. การตรวจวัดการเกิด Lipid peroxidation (Buege and Aust, 1978)

2.1 นำเซลล์ตับอิสระที่แยกได้ตัวอย่างละ 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย stock TCA-TBA-HCl (15 % Trichloroacetic acid และ 0.375 % Thiobarbituric acid ใน 0.25 N Hydrochloric acid) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.2 incubate ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.3 ปั่นแยกของเหลวลอยตัว ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที

2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ malondialdehyde (MDA) คำนวณจากค่า extinction coefficient (1.56×10^{5} $M^{-1} cm^{-1}$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การตรวจวัด activity ของเอนซัยม์ GOT & GPT (Reitman and Frankel, 1957)

การทำ calibration curve ทำโดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ standard pyruvate และ substate ดังนี้

Tube No.	Pyruvate standard	GOT หรือ GPT substrate (ml)	H_2O (ml)	GOT Activity (SF units/ml)	GPT Activity (SF units/ml)
1	0.00	0.50	0.1	0	0
2	0.05	0.45	0.1	20	25
3	0.10	0.40	0.1	55	50
4	0.15	0.35	0.1	95	83
5	0.20	0.30	0.1	148	126

1. เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 มิลลิลิตร ทุกหลอดทดลอง
2. ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
3. เติม 0.4 N NaOH 5 มิลลิลิตร ทุกหลอดทดลอง
4. ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
5. นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set 0
6. plot curve ระหว่าง GOT units และ GPT units กับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละค่า
7. ลากเส้นต่อแต่ละจุดจะได้ calibration curve ของการวิเคราะห์ activity ของ GOT & GPT

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์หา activity ของ GOT

1. ใส่ GOT substrate 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองทุกหลอด
2. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
3. เติม supernatant 0.1 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
4. ผสมแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
5. เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 มิลลิลิตร ต่อหลอดทดลอง
6. ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที
7. เติม 0.4 N NaOH 5 มิลลิลิตร ต่อหลอดทดลอง
8. ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
9. นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง
10. นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหา GOT activity จาก GOT calibration curve จะได้ค่า GOT

การวิเคราะห์หา activity ของ GPT

1. ใส่ GPT substrate 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองทุกหลอด
2. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
3. เติม supernatant 0.1 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
4. ผสมแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. เติม dinitrophenylhydrazine 0.5 มิลลิลิตร ต่อหลอดทดลอง
6. ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที
7. เติม 0.4 N NaOH 5 มิลลิลิตร ต่อหลอดทดลอง
8. ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
9. นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง
10. นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหา GPT activity จาก GPT calibration curve จะได้ค่า GPT

4. การตรวจวัด activity ของเอนซัยม์ในปฏิกิริยา Aminopyrine demethylation (Mazel, 1972)

การทำ Standard curve of Aminopyrine demethylation

1. นำ 0.1 mM Formaldehyde 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในทุกหลอดทดลอง

2. เติม Nash reagent (30% ammonium acetate + 0.4% acetyl acetone) 2.0 มิลลิลิตร

3. ผสมแล้วนำไป incubate ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

5. นำค่าที่วัดได้ไป plot curve ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ formaldehyde ลากเส้นต่อจุดที่ได้จะได้ calibration curve ของการวิเคราะห์ Aminopyrine demethylation

การวิเคราะห์หาเอนซัยม์ Aminopyrine demethylase

1. นำเซลล์ตับอิสระที่แยกได้ 3.0 มิลลิลิตร เติม 5 mM semicarbazide ใน 0.1 M Tris buffer และ 5 mM aminopyrine 0.1 มิลลิลิตร

2. incubate 37 องศาเซลเซียส 30 นาที

3. นำไปปั่น 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

4. นำของเหลวลอยตัวที่แยกได้ 2 มิลลิลิตร เติม Nash reagent (30% ammonium acetate in water + 0.4% acetyl acetone) 2 มิลลิลิตร

5. incubate 50 องศาเซลเซียส 10 นาที

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

7. นำค่าที่ได้ไปหาค่าของเอนซัยม์ Aminopyrine demethylase จาก Standard curve

4. วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษา *in vitro* แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาความเป็นพิษของ xanthones ต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากตับของหนูขาว

เป็นการศึกษาขนาดของ xanthones ที่ทำให้เกิดพิษต่อตับ โดยอาศัยหลักเกณฑ์การวัดระดับความเป็นพิษจากการวัดปริมาณ GOT, GPT, MDA และ GSH โดยแบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัวอย่างดังนี้

กลุ่มที่ 1 control ไม่ได้รับสารใด
กลุ่มที่ 2 ได้รับ DMSO จำนวน 10 ไมโครลิตร
กลุ่มที่ 3 ได้รับ xanthones 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
กลุ่มที่ 4 ได้รับ xanthones 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
กลุ่มที่ 5 ได้รับ xanthones 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

เมื่อแยกเซลล์ตับอิสระของหนูขาวแล้ว นำเซลล์ตับไป incubate ร่วมกับ Xanthones เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วจึงนำเซลล์ตับตัวอย่างมาตรวจหา activity ของเอนซัยม์ GOT, GPT และค่า MDA และ GSH ต่อไป

ตอนที่ 2 ศึกษาความเป็นพิษของ xanthones ต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากตับของหนูขาว เมื่อให้ร่วมกับ carbon tetrachloride (CCl_4)

เป็นการศึกษาผลของ xanthones ต่อตับ เมื่อให้ร่วมกับ carbon tetrachloride (CCl_4) โดยอาศัยหลักเกณฑ์การวัดระดับความเป็นพิษจากการวัดปริมาณ GOT, GPT, MDA และ GSH โดยแบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัวอย่างดังนี้

กลุ่มที่ 1 control ไม่ได้รับสารใด
กลุ่มที่ 2 ได้รับ DMSO จำนวน 10 ไมโครลิตร และ CCl_4 จำนวน 10 ไมโครลิตร
กลุ่มที่ 3 ได้รับ xanthones 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
และ CCl_4 จำนวน 10 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 4 ได้รับ xanthones 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
และ CCl_4 จำนวน 10 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 5 ได้รับ xanthones 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
และ CCl_4 จำนวน 10 ไมโครลิตร

วิธีการทดลอง

เมื่อแยกเซลล์ตับอิสระของหนูขาวแล้ว นำเซลล์ตับไป incubate ร่วมกับ xanthones และ CCl_4 ปริมาณ 10 µl เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วจึงนำเซลล์ตับตัวอย่างมาตรวจหา activity ของเอนซัยม์ GOT, GPT และค่า MDA และ GSH ต่อไป

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของ xanthones ต่อเอนซัยม์ในปฏิกิริยา Aminopyrine demethylation

เป็นการศึกษาผลของ xanthones ในขนาดต่าง ๆ ต่อ activity ของเอนซัยม์ในปฏิกิริยา Aminopyrine demethylation

กลุ่มที่ 1 control ไม่ได้รับสารใด

กลุ่มที่ 2 ได้รับ DMSO จำนวน 10 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 3 ได้รับ xanthones 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 ได้รับ xanthones 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 5 ได้รับ xanthones 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

เมื่อแยกเซลล์ตับอิสระของหนูขาวแล้ว นำเซลล์ตับไป incubate ร่วมกับ Xanthones เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วจึงนำเซลล์ตับตัวอย่างมาตรวจหา activity ของเอนซัยม์ในปฏิกิริยาของ Aminopyrine demethylation นำไปหาค่าใน Standard curve

2. การศึกษา *in vivo* แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ตอน ดังนี้

<u>ตอนที่ 1</u> ศึกษาผลของ xanthones 100 mg ต่อหนูหนัก 1 kg เมื่อได้รับในระยะเวลา 3, 5 และ 7 วันตามลำดับ

เป็นศึกษาผลของ xanthones 100 mg ต่อ หนูหนัก 1 kg ทางปาก ก่อนการแยกเซลล์ เป็นเวลา 3, 5, และ 7 วัน ตามลำดับ โดยอาศัยหลักเกณฑ์การวัดระดับความเป็นพิษจากการวัดปริมาณ GOT, GPT, MDA และ GSH โดยแบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัวอย่างดังนี้

กลุ่มที่ 1 control ไม่ได้รับสารใด

กลุ่มที่ 2 ได้รับ Tween จำนวน 2 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 3 วัน

กลุ่มที่ 4 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 5 วัน

กลุ่มที่ 5 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน

วิธีการทดลอง

ให้ xanthones โดยการกิน (oral) เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ จากนั้นทำการแยกเซลล์ตับ incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วจึงนำเซลล์ตับตัวอย่างมาหาค่า activity ของเอนซัยม์ GOT GPT และค่า MDA และ GSH ต่อไป

<u>ตอนที่ 2</u> ศึกษาผลของการได้รับ xanthones 100 mg ต่อหนูหนัก 1 kg ทางปาก เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ ร่วมกับการให้ CCl_4 10 และ 20 ไมโครลิตร กับ isolated cell โดยตรง

เป็นศึกษาผลของการได้รับ xanthones 100 mg ต่อหนูหนัก 1 kg ทางปาก ก่อนการแยกเซลล์ เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ ร่วมกับการให้ CCl_4 10 และ 20 ไมโครลิตร กับ isolated cell โดยตรง โดยอาศัยหลักเกณฑ์การวัดระดับความเป็นพิษจากการ

วัดปริมาณ GOT, GPT, MDA และ GSH โดยแบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัวอย่างดังนี้

กลุ่มที่ 1 control ไม่ได้รับสารใด

กลุ่มที่ 2 ได้รับ Tween จำนวน 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน

กลุ่มที่ 3 ได้รับ Tween จำนวน 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน

กลุ่มที่ 4 ได้รับ Tween จำนวน 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 5 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 3 วัน

กลุ่มที่ 6 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 5 วัน

กลุ่มที่ 7 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน

วิธีการทดลอง

ในการศึกษากลุ่มของ tween ให้ tween โดยการกิน (oral) เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ ในการศึกษากลุ่มของ xanthones ให้ xanthones โดยการกิน (oral) เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกัน เมื่อครบตามจำนวนวันแล้วทำการแยกเซลล์ตับ incubate ร่วมกับ CCl_4 ปริมาณ 10, 20 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วจึงนำเซลล์ตับตัวอย่างมาหาค่า activity ของเอนซัยม์ GOT GPT และค่า MDA และ GSH ต่อไป

<u>ตอนที่ 3</u> ศึกษาผลของ xanthones ต่อเอนซัยม์ในกระบวนการเมตาโบลิสม ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว

เป็นการศึกษาผลของ xanthones ต่อเอนซัยม์ในกระบวนการเมตาโบลิสม ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว เมื่อให้ xanthones โดยการกิน (oral) ก่อนการแยกเซลล์ 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ โดยการวัด activity ของเอนซัยม์ในปฏิกิริยา Aminopyrine demethylation แบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 1 control ไม่ได้รับสารใด

กลุ่มที่ 2 ได้รับ Tween จำนวน 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน

กลุ่มที่ 3 ได้รับ Tween จำนวน 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน

กลุ่มที่ 4 ได้รับ Tween จำนวน 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 5 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 3 วัน

กลุ่มที่ 6 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 5 วัน

กลุ่มที่ 7 ได้รับ xanthones ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การศึกษาใน Mitochondria

การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว

ทำโดยใช้วิธีของ Hogeboom 1955 ดัดแปลงโดย Myers and Slater 1957 ตลอดการเตรียมและการปฏิบัติการ ไมโตคอนเดรียจะแช่อยู่ใน medium ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา ส่วน refrigerated centrifuge ที่ใช้ในการปั่นแยกไมโตคอนเดรียใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเตรียมไมโตคอนเดรีย แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

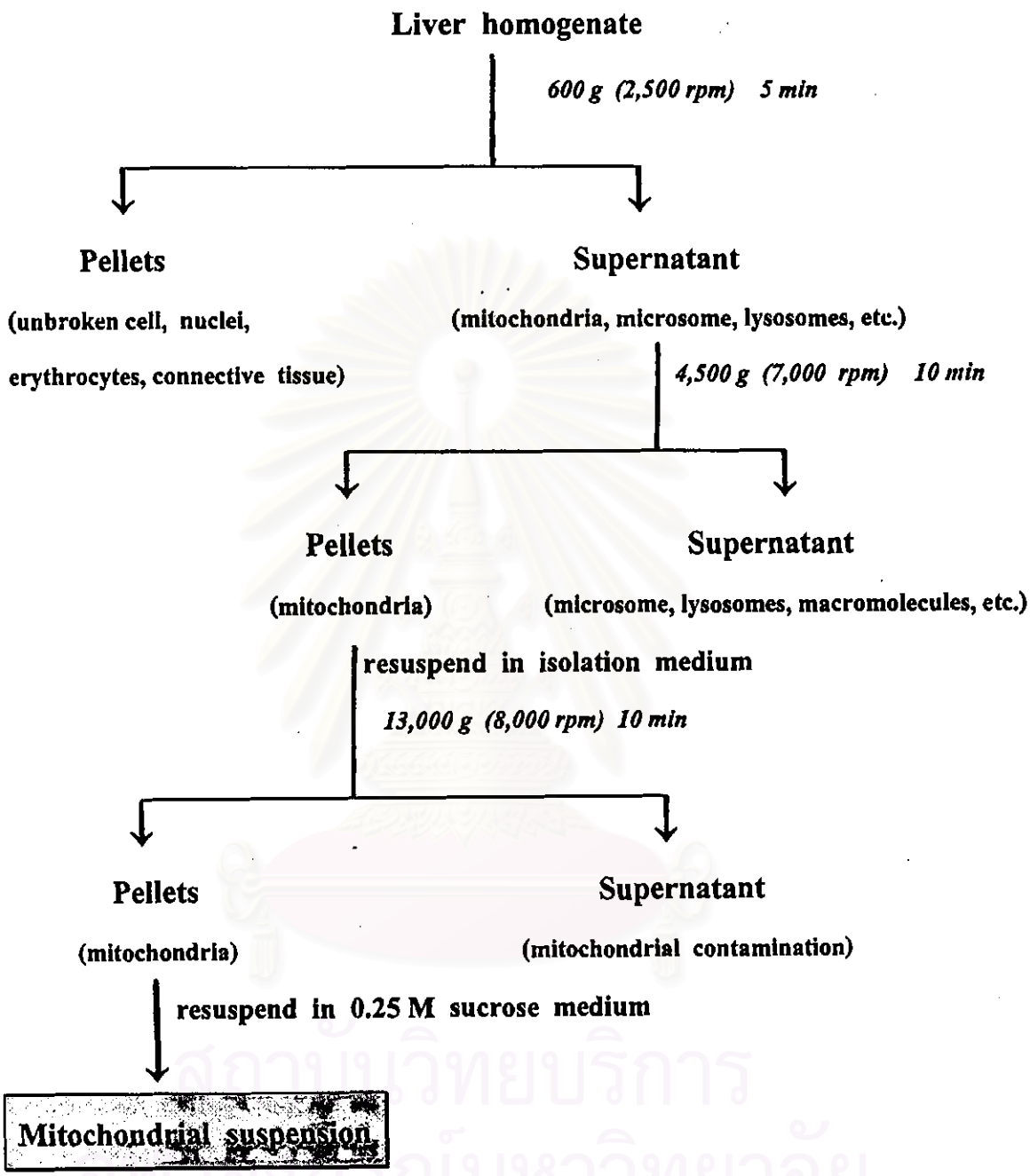
ขั้นตอนที่ 1

ทำให้หนูตายทันทีด้วยวิธี cervical dislocation ตัดตับล้างด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) 2 - 3 ครั้ง ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไป homoginize ด้วย homoginizer

ขั้นตอนที่ 2

ปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homoginate โดยใช้ Hitachi high speed refrigerated centrifuge Himac SCR 20B, rotor model RPR 18 - 3 ปั่นแยก 3 ครั้ง ดังแผนภาพ

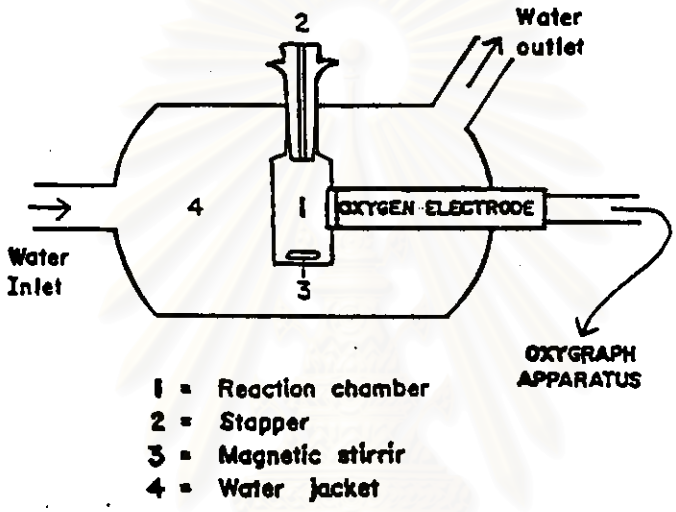
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 แสดงขั้นตอนการปั่นแยกไมโตคอนเดรีย rat liver homogenate โดยใช้ centrifuge (Hogeboom, 1955 ; Myers and Slater, 1957)

จากการปั่นครั้งสุดท้ายจะเห็นเป็น 2 ชั้น โดยชั้นบนจะเป็นส่วนของ ไมโครโซมมีสีชมพู ชั้นล่างเป็นชั้นของไมโตคอนเดรียมีสีน้ำตาล แยกชั้นที่เป็นไมโครโซมออกโดยล้างด้วย 0.25 M sucrose หลังจากนั้น resuspend ด้วย 0.25 M sucrose แล้ว homogenize ด้วยมือ จะได้ไมโตคอนเดรีย

ในการทดลองจะ incubate ใน Gilson reaction chamber ดังรูป



รูปที่ 18 Gilson reaction chamber

ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8 - 2.0 มิลลิลิตร และมีฝาเปิดปิดได้ เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง ซึ่งสามารถติดตามดูอัตราการลดลงของออกซิเจนได้ โดยใช้ Clark oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber และบันทึกอัตราการลดลงของออกซิเจน ซึ่งจะบันทึกออกมาในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนในสภาวะต่าง ๆ เรียกว่า oxygen - electrode tracing

ระหว่างที่ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ใน reaction chamber นั้น จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้สารต่าง ๆ เข้ากันดี และควบคุมอุณหภูมิของ reaction chamber ตามที่ต้องการโดยใช้น้ำที่ถูกปรับอุณหภูมิแล้วไหลผ่านเข้าออกอยู่ใน chamber ชั้นนอก

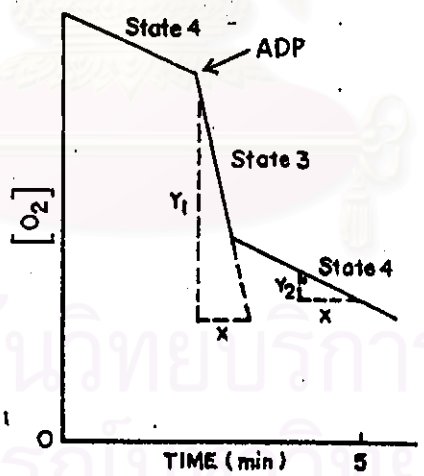
การเติมสารต่าง ๆ เพื่อทดลองนั้น จะใช้ microsyringe สอดลงในฝาจุก (stopper) ของ reaction chamber ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรบกวนปริมาณออกซิเจนใน reaction chamber ได้

การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory control index, RCI)

$$RCI = \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4}}$$

$$= \frac{\text{ความชันของ tracing state 3}}{\text{ความชันของ tracing state 4}}$$

ดังตัวอย่าง



รูปที่ 19 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงการหาค่า RCI

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = (R/P) x S ไมโครอะตอมออกซิเจน / นาที

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวนไมโครอะตอมของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

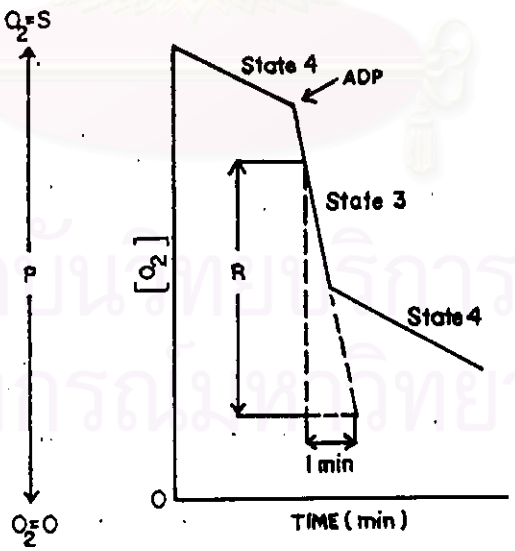
อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = (R/P) x A ไมโครอะตอมออกซิเจน / มิลลิลิตร/ นาที

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

A = จำนวนไมโครอะตอมของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ในน้ำ 1 มิลลิลิตร (ในการวิจัยนี้ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า A = 0.4449 ไมโครอะตอมออกซิเจน / มิลลิลิตร)

ดังตัวอย่าง



รูปที่ 20 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียระยะต่าง ๆ

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย ใช้วิธีของ Lowry et al., 1951 ดัดแปลงโดย Miller (1959) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เจือจาง mitochondria suspension 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรจะได้สารละลาย A

2. นำสารละลาย A 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และกรณีที่ทำ standard curve ใช้ 1 มิลลิลิตร ของ BSA ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร แทนสารละลาย A) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที

3. เติม Folin - Phenol reagent (dilution 1:10) 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าที่ได้เทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor จะได้ค่า ปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

การศึกษา xanthones ต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน

ศึกษาผลของ xanthones ต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน โดยใช้ xanthones ขนาด 0.16, 0.18 และ 0.20 µg/ml ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะที่มีการสร้าง ATP จาก ADP + Pi (state 3 respiration) สภาวะที่ ADP ถูกใช้ไปจนหมด (state 4 respiration) และสภาวะที่ใช้ uncoupling agent เช่น 2,4 dinitrophenol (DNP) กระตุ้นการหายใจ (state 3u respiration) เมื่อใช้สับสเตรทชนิดต่าง ๆ เช่น glutamate + malate และ succinate

5. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษา isolated rat hepatocytes

1. การแสดงผลการทดลอง แสดงเป็น 2 ลักษณะคือ
   - 1.1 ตาราง
   - 1.2 แผนภูมิแท่ง
2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
   - 2.1 ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± SEM)
   - 2.2 Two - tailed Student's unpaired t - test

การศึกษา mitochondria

1. Oxygraph tracings

   แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่าง ๆ เป็นตัวเลขในวงเล็บ

   (n atom oxygen / min / mg protein)
2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
   - 2.1 ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± SEM)
   - 2.2 Two - tailed Student's unpaired t - test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย