บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 180-200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์

2. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี

ในการเตรียม สารเคมีและตัวอย่างยา ต่างๆ จะใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง หรือ ultrapure water ส่วนสารเคมีที่ละลายได้น้อยหรือไม่ละลายในน้ำ จะใช้ absolute ethanol หรือ dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายแทน ในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการ จะใช้สารละลายของ KOH และ HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นหลัก

2.1 <u>แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย</u>

สารสังเคราะห์ CU-763-15-13 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีจากบริษัท Sigma chemical คือ

ADP, ATP, ammonium molybdate, bovine serum albumin (BSA), copper sulfate ($CuSO_4$), DMSO, DNP, DTT, EGTA, Folin & Ciocalteu' s phenol reagent, L-glutamic acid, malic acid, potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, potassium tartrate, rotenone, sodium hydroxide, sodium sulfite, sodium bisulfite,succinic acid, sucrose, magnesium chloride, potassium chloride, HEPES buffer, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid

สารเคมีจากบริษัท E. Merck,Darmstadt คือ

sodium carbonate, sulfuric acid,hydrochloric acid, potassium hydroxide, absolute ethanol

2.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นและปริมาณที่ใช้บ่อยๆของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำกลั่น(ultrapure water) ได้แก่

1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) ปริมาณ 10 µl, 1 M succinate (pH 7.2) ปริมาณ 10 µl, 0.2 M NADH ใน 1% $NaHCO_3$ ปริมาณ 10 µl, 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2 µl, 2 mM ADP ปริมาณ 10 µl, 0.1 mM $FeCl_3$ ปริมาณ 10 µl, 0.1 mM NADH ปริมาณ 10 µl, 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 0.05 M DNP ปริมาณ 2-6 µl, 0.1 M ATP (pH 7.2) ปริมาณ 150 µl, 1 M DTT ปริมาณ 2-3 µl, bovine serum albumin 250 mg/ml ปริมาณ 20-120 µl, 0.001 และ 0.25 M sucrose, 1 mM EGTA (pH 7.2), 1 M HEPES buffer, 1 M $MgCl_2$, 2.3 M KCl, 0.025 M และ 0.05 M potassium phosphate (KH_2PO_4), 0.2 M H_2SO_4 ปริมาณ 5 ml, 0.4 M $CaCl_2$ 10 µl, 15 µM $CdCl_2$ ปริมาณ 2 µl, 2.5 µM malonate ปริมาณ 10 µl 250 mM sucrose/ 5 mM Tris HCl buffer(pH 7.8), 15 % w/v trichloroacetic acid ; 0.375 % thiobarbituric acid ; 0.25 N HCl

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้ของสารเคมีที่ละลายใน DMSO ได้แก่

10 µg และ 20 µg rotenone ปริมาณ 10 µl, 10 µM rotenone ปริมาณ 10 µl, สาร CU-763-15-13 ในปริมาณ 50 , 100, 150, และ 200 µg

3. การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธี Differential centrifugation ตามวิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myers และSlater (1957) เป็นผู้ดัดแปลงวิธีเล็กน้อยและมีการรวบรวมเทคนิควิธีต่างๆโดย Sordahl et al. (1971) การเตรียมและปฏิบัติการนั้น ตับและไมโตคอนเดรียจะถูกเก็บโดยแช่อยู่ใน medium ที่เย็นจัดซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (icc-cold) การปั่นแยกไมโตคอนเดรียจากตับหนูทำโดยใช้ refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C ตลอดการเตรียม

ขั้นตอนการเตรียมแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลักคือ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> : การเตรียม liver homogenate

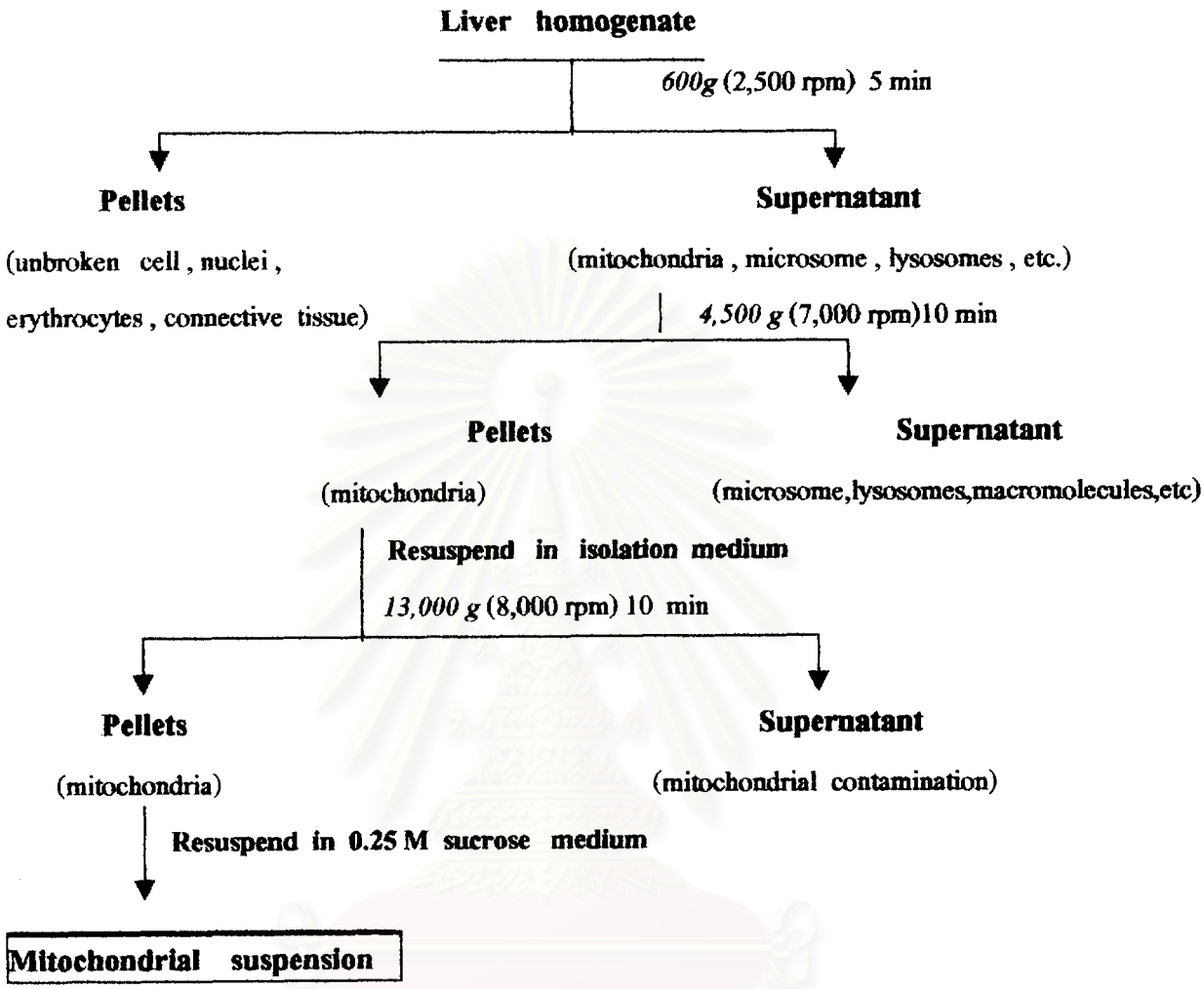
(1.) ทำให้หนูตายทันทีโดยการตีที่หัวบริเวณท้ายทอยแล้วทำ cervical dislocation จากนั้นผ่าตัดเปิดหน้าท้องแล้วรีบตัดตับมาล้างด้วยสารละลาย isolated medium ที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) ที่เย็นจัดหลายๆครั้งจนหมดเลือด แล้วแช่ตับในสารละลาย isolated medium ปริมาตรประมาณ 60-70 ml

(2.) ตัดตับด้วยกรรไกรออกเป็นชิ้นเล็กๆประมาณ 0.3-0.5 ซม. ล้างเลือดอีกครั้งด้วยสารละลาย isolated medium จากนั้นนำไป homogenize ด้วย Heidolph tissue homogenizer type SO203 RZR2 ประมาณ 2-3 นาที (6-7 ครั้ง) จะได้ liver homogenate ประมาณ 60-80 ml

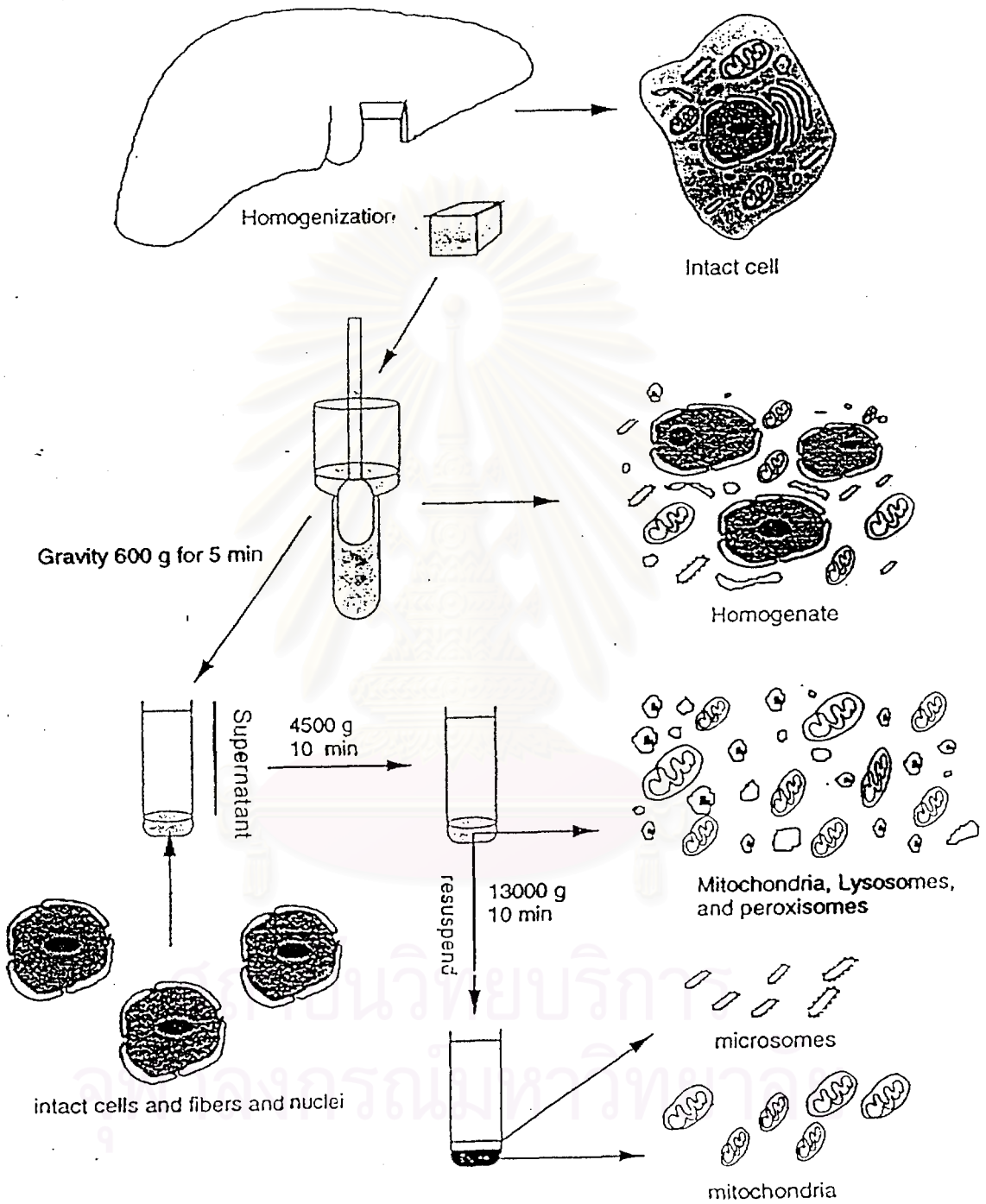
<u>ขั้นตอนที่ 2</u> : การปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาปั่นแยก (centrifuge) ให้ได้ไมโตคอนเดรียโดยใช้ Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge Himac model SCR 20B Rotor model RPR 18-3 โดยปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 17 และ 18

pellets ที่ได้จากการปั่นครั้งที่ 3 จะเห็นแยกเป็น 2 ชั้นชัดเจนในหลอด centrifuge ชั้นบนจะเห็นเป็นสีชมพูและเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ คือ ชั้นของไมโครโซม (microsomes) ส่วนชั้นล่างที่มีสีน้ำตาลและเกาะกันแน่น คือ ชั้นของไมโตคอนเดรีย รินส่วนของ supernatant ทิ้งและล้างส่วนที่เป็นไมโครโซมออกให้หมดด้วย 0.25 M sucrose เล็กน้อย จนเหลือเพียงส่วนของไมโตคอนเดรียที่มีสีน้ำตาล นำมา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 ml homogenize ด้วยมืออย่างเบาๆจะได้ mitochondrial suspension สำหรับใช้ในการทดลอง ความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียคิดเป็นปริมาณโปรตีน มีค่าประมาณ 30-60 mg/ml และเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับเสตรทจะได้ค่า RCI ประมาณ 5-8



รูปที่ 17 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้ differential centrifuge (Hogeboom, 1955; Myers and Slater, 1957; Sordahl,1971)



รูปที่ 18 ภาพประกอบการเตรียมไมโตคอนเดรีย

การเตรียม osmotic-shocked mitochondria

นำ mitochondrial pellets ที่เตรียมได้ จากวิธีดังกล่าวข้างต้นมา resuspend ในสารละลาย 0.01 M sucrose ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงหมุนกวนช้าๆด้วย magnetic stirrer ให้ suspension เข้ากันตลอดเวลา เมื่อครบกำหนดเวลานำ osmotic-shocked mitochondria ที่ได้เก็บในภาชนะแช่น้ำแข็ง (icc-bath) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียม submitochondrial particles

นำ mitochondria pellets ที่เตรียมได้ จากวิธีดังกล่างข้างต้นมา resuspend ในสารละลาย 250 mM sucrose / 5 mM Tris HCl buffer , pH 7.8 พอประมาณ (3-4 ml) นำไป sonicated โดยใช้ Soniprep 150 ultrasonic disintegrator ที่ out put 4 A เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 ^{0}C จากนั้นนำ fraction ที่ได้ไปปั่นที่ 27,000 g เป็นเวลา 15 นาที และปั่นที่ 77,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 ^{0}C โดยใช้เครื่อง L-80 Ultracentrifuge ของ Beckman, ใช้ Rotor Type 70 Ti , serial NO.97U269 และในการปั่นแต่ละครั้งจะใช้ sucrose-Tris solution ล้างและเมื่อได้ pellet ก็นำมา resuspend ด้วยสารละลายเดิมก็จะได้ submitochondrial particles มาใช้ในการทดลองเกี่ยวกับ Lipid peroxidation (วิธีการดังกล่างข้างต้นดัดแปลงมาจากวิธีของ Knowles and Penefsky , 1972)

4. การเตรียม Incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

incubation medium ที่ใช้ในการวิจัยแบ่งตามสภาวะการทดลองได้ดังนี้

4.1 incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับศึกษาอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ประกอบด้วย :				
	HEPES buffer	40	mM	(60 mOsm)
	$MgCl_2$	2	mM	(6 mOsm)
	KCl	92	mM	(184mOsm)

(เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 milliOsmolar) ปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2

4.2 hypotonic incubation medium สำหรับวัดอัตราการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria

ประกอบด้วย :				
	HEPES buffer	40	mM	(60 mOsm)
	$MgCl_2$	2	mM	(6 mOsm)
	KCl	29.5	mM	(59 mOsm)

5. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique (Sordahl et al.,1971) เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ Gilson reaction chamber (รูปที่ 19) ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2.0 ml ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้นและมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรูเล็กๆสำหรับเติมสารต่างๆลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรียใน reaction chamber ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรบกวนปริมาณออกซิเจนใน reaction chamber ขณะทำการทดลอง เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง ซึ่งสามารถติดตามดูอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ได้ โดยใช้ Clark oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับของเหลวใน chamber และปริมาณการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนที่วัดได้โดย oxygen electrode นี้ จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) ซึ่งจะมีหน้าปัทม์บอกปริมาณของออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ในขณะนั้นๆซึ่งสามารถบันทึกอัตราการลดลงของออกซิเจนใน reaction chamber ด้วย Gilson recorder (model N2) บันทึกผลที่ได้ออกมาในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนในสภาวะต่างๆ tracing ที่ปรากฏบนกระดาษบันทึกโดยวิธีนี้เรียกว่า oxygen-electrode tracing (polarographic tracing or oxygraph tracing)

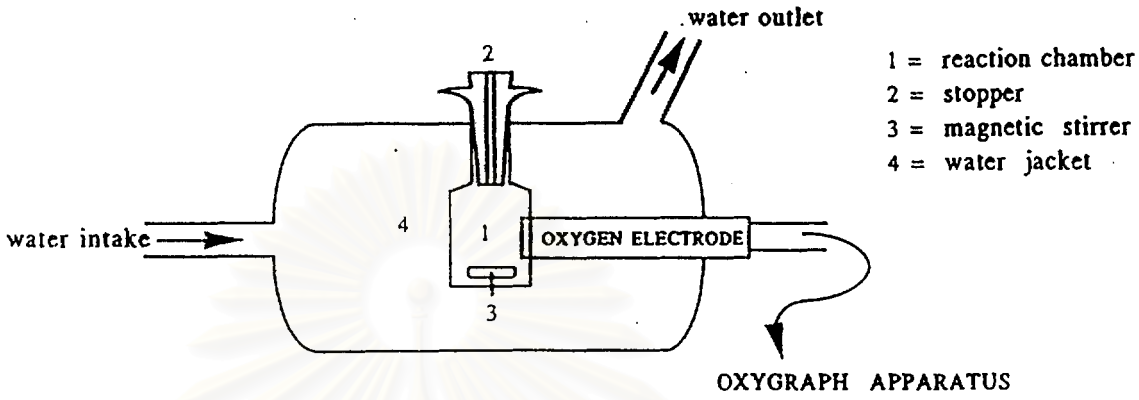
ในระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่างๆใน reaction chamber นั้นจะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ส่วนประกอบต่างๆของปฏิกิริยาใน reaction chamber เข้ากันดีตลอดเวลา ใช้น้ำที่ปรับอุณหภูมิจากอ่างควบคุมอุณหภูมิไหลผ่านเข้าและออกส่วนของ chamber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งห่อหุ้ม reaction chamber ไว้อีกทีหนึ่ง น้ำที่มีอุณหภูมิตามที่ต้องการจะวนเวียนหล่อเลี้ยงอยู่รอบนอก reaction chamber ทำให้อุณหภูมิของการทดลองใน reaction chamber คงที่ตามต้องการ ในที่นี้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 ^{0}C

เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาปริมาณออกซิเจนใน chamber จะมีค่าที่ระดับ 100% saturation แต่เมื่อไมโตคอนเดรียมีการหายใจ ปริมาณออกซิเจนใน chamber จะค่อยๆลดลง วัดอัตราการลดลงของออกซิเจนใน chamber ได้ด้วย Clark oxygen electrode (รูปที่ 20) ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode ล้อมรอบด้วย platinum electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้ว cathode เมื่อต้องการใช้งานจะใช้ half saturated KCl solutionฉาบผิวขั้ว electrode ทั้งสอง ทำหน้าที่เป็น salt bridge และมี YSI membrane (standard type) หุ้มปิดที่ขั้วของ electrode โดย membrane ชนิดนี้ยอมให้เฉพาะออกซิเจนผ่านเท่านั้น

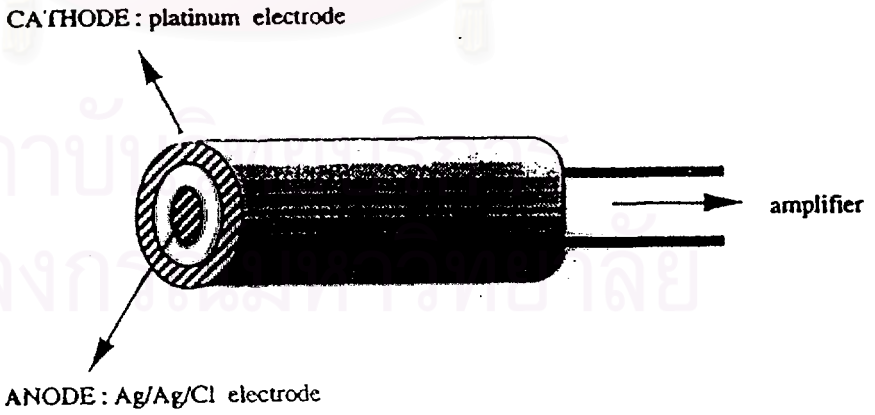
ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ

anode : $4Ag^{+} + Cl^{-} \longrightarrow 4AgCl + 4e^{-}$

cathode: $4H^{+} + 4e^{-} + O_2 \longrightarrow 2H_2O$



รูปที่ 19 แสดง Reaction chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor + recorder)



รูปที่ 20 แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งเป็น Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว cathode

ปกติระหว่างขั้วทั้งสองจะมี polarizing voltage 0.8 V เมื่อทำปฏิกิริยาดังสมการข้างต้นจะมีการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่าง 2 ขั้ว เกิดขึ้นและกระแสที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยัง amplifier ซึ่งทำหน้าที่ขยายกระแสเข้าสู่ recorder บันทึกเป็น tracing ต่อไป ปริมาณกระแสจะแปรผันตามปริมาณออกซิเจนใน chamber ทำให้สามารถวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้

การแบ่งภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโตคอนเดรีย มีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจน สับเสตรท ADP + Pi หรือการมี uncoupler หรือไม่ เป็นต้น Chance and William (1956) ได้จัดแบ่งภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญ เป็นดังนี้

State	Condition
1	มีเพียง O_2
2	มี O_2 และ ADP
3 (active state)	มี O_2 ADP และ Substrate
3u	มี uncoupler
4 (resting state)	มี O_2 และ Substrate
5	มีเพียง Substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess Ca^{2+}

6. การคำนวณดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI), อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

6.1 การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index,RCI)

นอกจาก Chance and William จะแบ่งภาวะ (states) การหายใจของไมโตคอนเดรียเป็นภาวะต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริเลชันค่า RCI นี้แสดงถึงคุณภาพของไมโตคอน

เตรียมที่เตรียมได้ว่ามีคุณภาพดี คือเป็น intact mitochondria หรือไม่ โดยปกติแล้วจะมีค่า RCI = 5 – 8 การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้

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

$$= \frac{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state 3}}{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state 4}}$$

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 21 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน x ของทั้ง 2 states ยาวเท่ากันดังนั้น

$$RCI = \frac{Y_1/X}{Y_2/X} = \frac{Y_1}{Y_2}$$

6.2 การคำนวณค่า P / O ratio

P/O ratio คือ อัตราส่วนของจำนวนโมเลกุลของ ATP ที่ถูกสร้างต่อออกซิเจน 1 อะตอม ($1/2\ O_2$) ใน state 3 respiration ค่า P/O ratio สามารถคำนวณได้ตามวิธีที่บรรยายไว้โดย Estabrook (1967) ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

$$P/O = \frac{\text{จำนวน nmoles ของ ATP ที่ถูกสร้างขึ้น}}{\text{จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3}}$$

จำนวน nmoles ของ ATP ที่สร้างขึ้นจะเท่ากับ nmoles ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยาและสามารถคำนวณจากความเข้มข้นและปริมาตรของ ADP ที่เติมลงไป

จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างการเกิด state 3 คำนวณได้จาก oxygraph tracing ดังตัวอย่างรูปที่ 22 ดังนี้

$$\text{จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ใช้ระหว่างการเกิด state 3} = Q \times \frac{S}{P}$$

โดยที่ P = ความสูงของเส้น P ในรูป

Q = ความสูงของเส้น Q ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง คือ ถ้ามีปริมาตรของ reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มาก และถ้าอุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่อมีอุณหภูมิสูง

การคำนวณหาค่า S จะหาได้จากค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 ml (A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา จะได้จำนวนของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 ml หาได้จากสมการ

$$A = \frac{s \times P \times N \times 10^{9}}{V\ 100} \text{ natoms O/ml}$$

เมื่อ A = จำนวน n atoms ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 ml

S = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ $0\ ^{0}C$ และ 760 mm แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตรเมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 mm) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ $37^{0}C$

P = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

V = ปริมาตรก๊าซที่ $0\ ^{0}C$ ความดัน 1 บรรยากาศเทียบกับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 ml

เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการดังกล่าว คำนวณหาค่าปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 ml (A) ที่อุณหภูมิ $37^{0}C$ มีค่าเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

6.3 การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 23 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ได้ดังนี้

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{\mathbf{R} \times \mathbf{S}\ \text{n atoms O/min}}{\mathbf{P}}$$

โดยที่ **R** = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียแล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีหน่วยเป็น n atomsO/min/mg protein

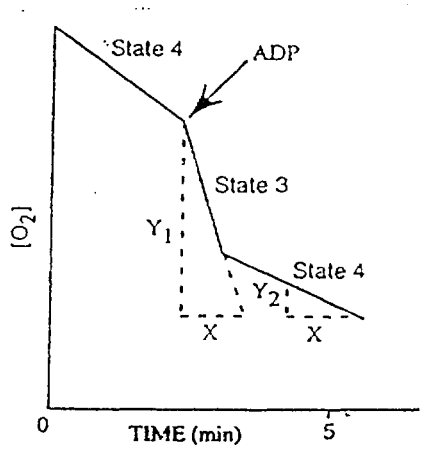
นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ออกมาในหน่วยของจำนวน n atoms O/ml/min ได้ ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ 23 เช่นกัน

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{\mathbf{R} \times \mathbf{A}\ \text{n atoms O/ml/min}}{\mathbf{P}}$$

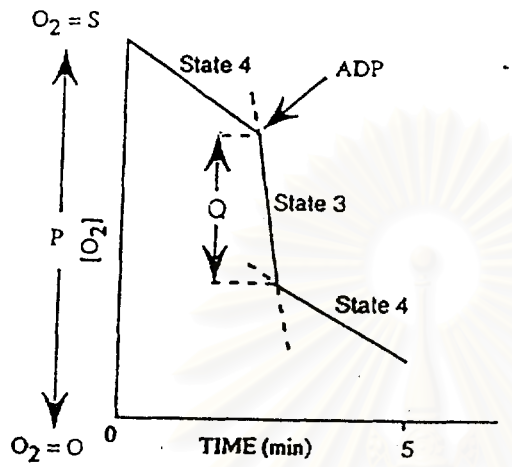
โดยที่ **R** = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

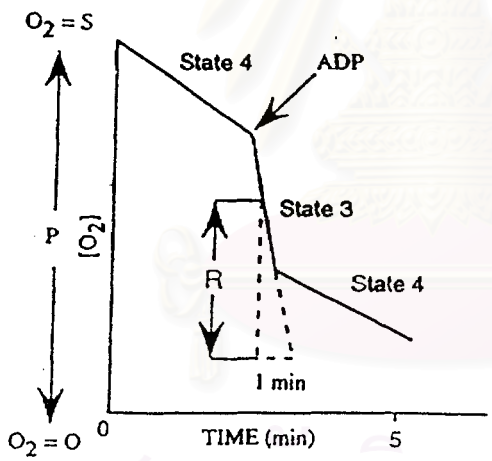
A = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัว อยู่ในน้ำ 1 ml



รูปที่ 21 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 22 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน P/O



รูปที่ 23 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

ค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 6.2 ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมคงที่ที่ 37°C ซึ่งค่า A ในที่นี้ จึงเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆของ oxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

7. การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลสิสของ ATP จะเกิดผลผลิตคือ ADP,Pi และ H^+ ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$ATP + H_2O \xleftrightarrow{\text{ATPsynthase } (F_0F_1 \text{ ATPase})} ADP + Pi + H^+$$

ดังนั้นในการศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรียสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

7.1 โดยการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (Bertina and slater, 1975)

7.2 โดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

ในการวิจัยนี้จะเลือกใช้วิธีวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายของ ATP ในการวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้คือ

<u>ขั้นตอนที่1</u> เป็นการ incubated ไมโตคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ ทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตร ของ trichloroacetic acid จำนวน 1 ml อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น จากที่ได้ในขั้นที่ 1 ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent (ประกอบด้วย 15% sodium bisulfite 97.5 ml , 20% sodium sulfite 2.5 ml และ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนดแล้วนำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จากกราฟมาตรฐานของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆครอบคลุมค่าของตัวอย่าง

วิธีการวัดหา ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 ml ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37 ^{0}C ส่วนล่างของภาชนะทรงสูงจะมี magnetic stirrer คอยหมุนกวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา
2. เติม mitochondrial suspension 200 µl
3. เติมตัวยาที่ต้องการทดสอบแล้วรอเวลา 1 นาที (ถ้าเป็นการทดลองที่ใช้เป็น control อาจจะเติม solvent ที่ใช้ละลายตัวยาในปริมาตรที่เท่ากัน)
4. เติม 0.1 M ATP 150 µl แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
5. เมื่อครบกำหนดเวลา 10นาทีแล้วจึงดูด reaction mixture มาเป็น sample ปริมาณ 1 ml แล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ที่มี 20% w/v ของ trichloroacetic acid 1 ml อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที
6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm นาน 10นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน
7. ดูดส่วน supernatant 1 ml (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 ml แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 ml ของ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 mM แทน) แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 M H_2SO_4 5 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน
8. เติม 2.5 % w/v ammonium molybdate 0.8 ml
9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 ml เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample จะนำมาคำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 2 = 6) จะได้เป็นค่าปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นตามต้องการ

(หมายเหตุ : ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2naphthol-4-sulfonic acid ละลายไม่หมด ให้กรองออก โดยใช้กระดาษกรองและเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ไม่เกิน 1 เดือน)

8. การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

ความเข้มข้นหรือปริมาณไมโตคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้จากตับหนูขาว สำหรับใช้ในการทดลองในแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในการวิจัยนี้ ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายด่างจะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper กับอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นมาตรฐาน

วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension 10 µl ด้วยน้ำกลั่น 3 ml (1:300) จะได้สารละลาย A
2. ดูดสารละลาย A ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลองเติม alkaline copper reducing agent 1 ml (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำ 1 ml ส่วนในกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1ml ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/ml แทนสารละลาย A) เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
3. เติม Folin-Phenol reagent (dilution 1:10) 3 ml เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50 ^{0}C เป็นเวลานาน 10 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 100) จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียหน่วยเป็น mg/ml

การเตรียมสารละลายที่ใช้

-Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5% $CuSO_4$ ที่ละลายอยู่ใน 1% (w/v) ของ potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10% Na_2CO_3 ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH

-Folin-Phenol reagent (1:10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin-Ciocalteu's Phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (v/v) และเตรียมใช้ทันที

9. การวัดการเกิด lipid peroxidation (Haraguchi et al., 1995) มีวิธีการดังต่อไปนี้

1. นำ rat liver submitochondrial particles (equivalent 0.3 mg protein) มา incubate ใน 1 ml ของ reaction mixture [ประกอบด้วย 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 2 mM ADP, 0.1 mM $FeCl_3$, 10 μM rotenone และ 0.1 mM NADH] ที่ 37 ^{0}C
2. หลังจากใส่ 0.1 mM NADH ไปแล้วจะทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 5 นาที (ได้สารละลาย A)
3. จากนั้นนำสารละลาย A มา 1 ml ใส่ใน 3 ml ของ TCA-TBA HCl reagent (15% w/v trichloroacetic acid ; 0.375 % thiobarbituric acid ; 0.25 N HCl)
4. นำสารละลายหลังจากทำปฏิกิริยามา incubated ใน water bath 15 นาทีที่อุณหภูมิ 100 ^{0}C
5. จากนั้นนำสารละลายมา centrifuged ที่ 1000 x g 10 นาที
6. นำ supernatant มาวัดหา absorbance ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ malondialdehyde (MDA) คำนวณจากค่า extinction coefficient (E) ซึ่งมีค่าเท่ากับ $1.56 \times 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$

จากกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's law) กล่าวไว้ว่า "ค่า absorbance ของสารละลายจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น" ดังนั้นจะได้สูตรการหาปริมาณความเข้มข้นจากค่า absorbance ดังต่อไปนี้

$$\boxed{A = abc}$$

A = ค่า absorbance (OD)

a = ค่า absorptivity (E, extinction coefficient)

b = ความกว้างของ absorption cell หน่วยเป็น เซนติเมตร (ระยะที่แสงผ่านเป็น ซม.)

c = ความเข้มข้น หน่วยเป็น โมล / ลิตร

E ของ MDA = $1.56 \times 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$ หมายถึง เมื่อแสงผ่านความเข้มข้นของสารละลาย 1 mole/l ในระยะทาง 1 cm. จะให้ค่า OD เท่ากับ $1.56 \times 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$

10. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

10.1 การแสดงผลการทดลอง แสดงเป็น 2 ลักษณะคือ

10.1.1 Oxygraph tracing

เป็น oxygraph tracing ที่ได้จากการทดลอง แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆด้วยตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บซึ่งกำกับแต่ระยะของ oxygraph tracing มีหน่วยเป็น n atomsO/ml/min

10.1.2 ตารางและแผนภูมิแท่ง

10.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้ใช้สถิติชนิด two-tailed unpaired Student's t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย