หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

2. การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว

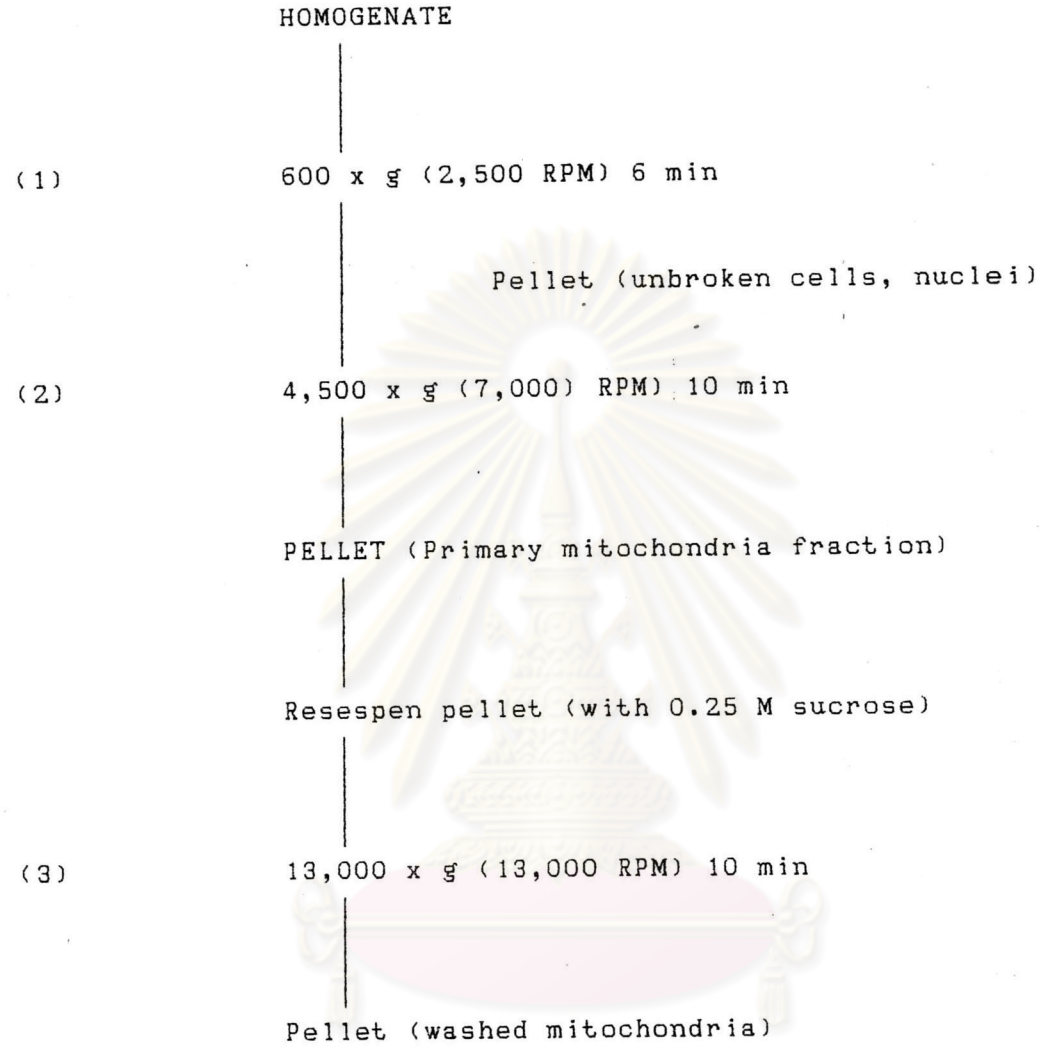
ใช้วิธีของ Hodgeboom ซึ่ง Myers และ Slater (1957) เป็นผู้บรรยายไว้โดยดัดแปลงเล็กน้อย

ตลอดการเตรียมและการปฏิบัติการ ตับและไมโตคอนเดรียจะถูกเก็บโดยแช่อยู่ใน medium ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง เพื่อให้เย็นอยู่ตลอดเวลา ส่วนขณะปั่นแยกไมโตคอนเดรียด้วย refrigerated centrifuge ตั้งอุณหภูมิของเครื่องไว้ที่ 4°C

ขั้นตอนในการเตรียมไมโตคอนเดรีย อาจแบ่งได้ดังนี้

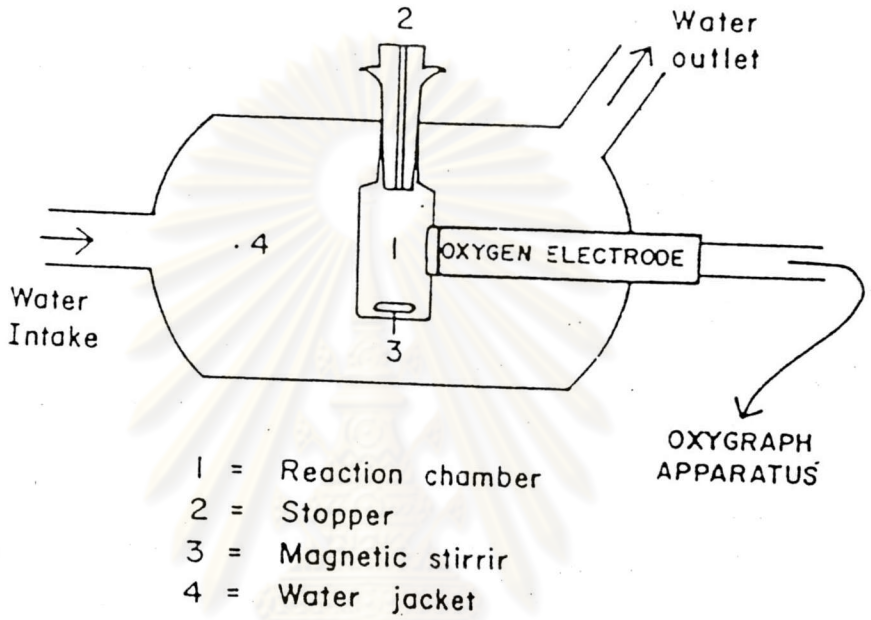
2.1 ทำให้หนูตายอย่างทันทีทันใดด้วยการตีหัวแล้วทำ cervical dislocation รีบตัดตับมาล้าง ใน medium ที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (ปรับ pH ที่ 7.2) ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกร แล้วนำไป homogenize ด้วย glass homoginizer เพื่อให้เซลล์ตับแตกใน ขั้นตอนนี้จะได้ rat liver homogenate ประมาณ 100 มล./หนู 1 ตัว

2.2 ปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate โดยใช้ Hitachi automatic high speed refrigerated centrifuge model 20 PR-52 D, roter model RPR 18-3 ของภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ดังรูปที่ 3



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate โดย differential centrifugation



รูปที่ 4 แสดง incubation chamber ซึ่งมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลออกมาได้ทันทีทาง oxygraph apparatus ซึ่งประกอบด้วย oxygen monitor และ recorder

จากรูปที่ 3 pellet ที่ได้จากการปั่นครั้งสุดท้ายจะเห็นเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นสีชมพูเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ คือชั้นของไมโครโซม ส่วนชั้นล่างเกาะกันแน่นและสีเข้มกว่า คือชั้นของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อริน supernatant fluid และชะส่วนไมโครโซมออกแล้ว resuspend ไมโตคอนเดรียด้วย 0.25 M sucrose โดยการ homogenize ด้วยมืออย่างเบา ๆ สุดท้ายจะได้เป็น mitochondrial suspension สำหรับใช้ในการวิจัยให้ได้ปริมาตรครั้งสุดท้าย ประมาณ 3 มล. ความเข้มข้นคิดเป็นปริมาณโปรตีน ของไมโตคอนเดรียประมาณ 40-80 มก./มล. และเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate จะได้ค่า RCI อยู่ระหว่าง 5-8

3. การ incubate ไมโตคอนเดรีย และ incubation medium

3.1 สำหรับการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

การ incubate ไมโตคอนเดรีย เพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียกระทำใน Gilson reaction chamber ดังรูปที่ 4 โดยปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ ที่ 30°C incubation medium ที่ใช้ในการวิจัยขั้นตอนนี้ ประกอบด้วย

1. Hepes buffer 40 mM (pH 7.2)
2. $MgCl_2$ 2 mM
3. KCl 92 mM

ซึ่งเป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsmolar

ส่วนการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมนั้น จะใช้ incubation medium ชนิดที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกัน แต่จะเพิ่มเติม KH_2PO_4 (Pi) ให้ได้ความเข้มข้น 1 mM

3.2 สำหรับการวัด monoamine oxidase activity

ใช้ phosphate buffer 0.025 M PH. 7.2 เป็น incubation medium

3.3 สำหรับการวัด ATPase activity

ใช้ incubation medium ที่ประกอบด้วย

1.	Hepes Buffer	5	mM (pH 7.2)
2.	$HgCl_2$	2	mM
3.	KCl	119	mM

ซึ่งเป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsmolar เช่นเดียวกันกับที่ใช้ในการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในหัวข้อ 3.1

4. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรีย

ในการวิจัยนี้ วัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเมื่อได้รับโลหะหนักในขนาดต่าง ๆ ทั้งชนิดเดียว และ สองชนิดร่วมกันโดยใช้ polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญคือ Gilson reaction chamber ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2 มล. และมีฝาจุก (stopper) สำหรับเปิดและปิดได้ใช้สำหรับ incubate ไมโตคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ นอกจากนี้ตรงกลางฝาจุกมีรูเล็ก ๆ สำหรับปลายเข็มของ microsyringe สอดลงไปใน reaction chamber เพื่อเติมสารต่าง ๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรบกวนปริมาณออกซิเจน ใน reaction chamber ขณะทำการทดลองได้ เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง เราสามารถติดตามอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ได้โดยมี oxygen electrode (Clark type) ต่อเข้าไปใน reaction chamber และติดตามผลของปฏิกิริยา ข้อมูลจาก oxygen electrode จะถูกส่งไปเข้าเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) ที่หน้าปัดเครื่องจะมีเข็มชี้บอก ถึงปริมาณออกซิเจนใน reaction chamber ในขณะนั้น ๆ ว่ามีอยู่มากน้อยเท่าใด ทำให้เราสามารถทราบอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ออกมาทันที โดยต่อ output เข้ากับเครื่อง Gilson recorder (model N2) ซึ่งจะมีปากกาคอยบันทึกผลที่ได้ลงในกระดาษกราฟที่กำลังเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วคงที่ tracing ที่ปรากฏบนกระดาษกราฟโดยวิธีนี้เราเรียกว่า oxygen-electrode tracing (polarographic tracing, oxygraph tracing) ซึ่งเราจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลองต่อไป

ระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรีย และระหว่างที่ไมโตคอนเดรียทำปฏิกริยากับสารต่าง ๆ ใน reaction chamber นั้นจะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ ส่วนประกอบต่าง ๆ ของปฏิกิริยาใน reaction chamber เข้ากันดีอยู่ตลอดเวลา และสามารถควบคุมอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ ที่ 30°C อยู่ตลอดเวลาโดยใช้น้ำที่ถูกปรับอุณหภูมิให้คงที่ ที่ 30°C ไหลเข้าออกอยู่ใน chamber ชั้นนอกเรียกว่า water jacket ซึ่งล้อมรอบ reaction chamber ไว้อีกทีหนึ่ง น้ำที่ปรับอุณหภูมินี้จะวนเวียนหล่อเลี้ยงอยู่รอบนอก raction chamber ตลอดเวลาทำให้อุณภูมิใน reaction chamber คงที่ตามไปด้วย

โดยวิธีการดังกล่าวนี้สามารถวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของโลหะหนักต่อกระบวนการ ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน และกระบวนการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซียมได้ โดยอาศัย incubation medium ที่เหมาะสมเฉพาะแต่ละปฏิกิริยาได้ ดังกล่าวแล้วในหัวข้อ 3.2

สำหรับการศึกษาถึงอิทธิพลของโลหะหนักต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase นั้นได้อาศัยหลักการในการติดตามปริมาณการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมาใช้ กล่าวคือ monoamine oxidase นั้น เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย ทำหน้าที่ ออกซิไดซ์ สารกลุ่ม catecholamines โดยปฏิกิริยา deaminated oxidation ซึ่งใช้ออกซิเจน ดังนั้น activity ของ monoamine oxidase จึงหาได้โดยการติดตามออกซิเจนที่ลดลง ใน reaction chamber เมื่อใช้ substrate และ incubation medium ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาซึ่งในการทดลองนี้ใช้ tyramine เป็น substrate ส่วน incubation medium นั้นได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.2 แล้ว นอกจากนี้เรายังเติม respiratory chain inhibitors ได้แก่ rotenone และ antimycin A ลงใน reaction chamber เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปนั้นเกิดจากการที่ monanine oxidase ออกซิไดซ์ substrate เพียงอย่างเดียว โดยหลักการนี้สามารถทราบถึง monoanine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อได้รับโลหะหนักได้ ในการทำการทดลองเพื่อศึกษาการทำงานของ MAO นี้ จะปรับอุณหภูมิของ reaction chamber ที่ 37°C

5. การวัด ATPase activity

ATPase หรือ ATP synthase เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย เป็น enzyme complex ที่ใช้ในการสร้าง ATP คือ F_1 -F_o complex ในกรณีที่ไมโตคอนเดรียมีการสร้าง ATP ได้น้อยมาก หรือสร้างไม่ได้เลย เช่น การเกิดอันคัปปลิง หรือ โครงสร้างของเยื่อหุ้มชั้นในบางส่วนถูกทำลายในกรณีของ aging mitochondria F_1 ที่ทำหน้าที่สร้าง ATP นั้นจะกระตุ้นให้มีการสลายตัวของ ATP (ATP hydrolysis) ดังปฏิกิริยา

$$ATP + H_2O \xrightleftharpoons{F_1} ADP + Pi + H^+$$

ผลการกระตุ้นการสลายตัวของ ATP นี้เรียกว่า ATPase activity ซึ่งในภาวะปกติจะพบว่ามีน้อยมาก ดังนั้นทางหนึ่งที่เราสามารถวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้ก็ คือ การวัดจำนวน H ที่เพิ่มมากขึ้นใน medium ซึ่งการวัดจะใช้ pH electrode ต่อเข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) เพื่อติดตามอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวน H^+ ใน medium และ บันทึกผลการทดลองลงใน Gilson recorder (model N2)

ทั้งนี้ต้องเทียบหาจำนวน H^+ โดยใช้กรดที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว ในการวิจัยนี้ใช้ H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.1098 N เป็นกรดมาตรฐาน

6. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง และแหล่งที่มาของสารเคมี

6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง

ในการวิจัยนี้จะละลายตัวยา และสารเคมีด้วยน้ำกลั่นที่ถูกกลั่นสองครั้ง (double-distilled water) เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนจากอิออนต่าง ๆ ที่อาจรบกวนผลการทดลองได้ ในกรณีที่ต้องปรับสารละลายให้ได้ pH 7.2 จะทำได้โดยใช้สารละลาย KOH ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นหลัก เมื่อตัวยาหรือสารเคมีใดละลายในน้ำได้น้อยมาก จึงจะนำไปละลายใน absolute ethanol โดยพยายามใช้ในปริมาณที่น้อยที่สุดเท่าที่ทำได้

ตัวอย่าง ความเข้มข้นและปริมาตร ของตัวยาและสารเคมีที่ละลายในน้ำกลั่น ที่ใช้บ่อย ๆ เช่น

1 M Glutamate + 1 M malate ปริมาตร 10 มคล. (pH 7.2)
1 M succinate ปริมาตร 10 มคล. (pH 7.2)
0.1 M ADP + 0.2 M Pi ปริมาตร 5-10 มคล. (pH 7.2)
0.1 M ATP ปริมาตร 250 มคล. (pH 7.2)
0.25 M sucrose
0.1 M EGTA (pH 7.2)
0.5 M Hepes buffer (pH 7.2)
เป็นต้น

ส่วนตัวอย่างความเข้มข้นและปริมาตรที่ใช้บ่อย ของตัวยาที่ละลายใน absolute ethanol เช่น

0.2 mg/ml CCCP 1-3 มคล.
10 mg/ml Rotenone 1 มคล.
เป็นต้น

6.2 แหล่งที่มาของตัวยาและเคมีที่ใช้ในการวิจัยมีดังต่อไปนี้

0.1098 N H_2SO_4 ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการเทียบหาจำนวน H^+ ได้รับจากภาควิชา เภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

sucrose, Hepes, l-glutamic acid, succinic acid, potassium chloride (Sigma Chemical)

magnesium chloride, sulfuric acid, hydrochloric acid, oligomycin, potassium phosphate, bovine serum albumin (E.Merck, Dannstadt)

absolute ethatnol (Riedel-De Haen AG. Seelae Hannover)

potassium tartrate (Analyticals Carlo Erba)

7. การแสดงผลการทดลอง และ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

7.1 Oxygraph tracing ลอกจาก oxygraph tracings ที่ได้จากการทดลอง อัตราการใช้ออกซิเจน ที่แสดงในวงเล็บมีหน่วยเป็นจำนวน มคอ. ของออกซิเจน/มล./นาที

7.2 tracing ที่แสดงปริมาณของ H^+ ลอกจาก tracing ที่ได้จากการทดลองในข้อ 5 อัตราการเพิ่มของ H^+ มีหน่วยเป็น นนม. H^+/มก. โปรตีน/5 นาที

7.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้ใช้ two-tailed paired Student's t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม กับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย