บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำวิจัย

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar เพศผู้หนักประมาณ 180-200 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมตามวิธีของ Hogeboom (38) โดยดัดแปลงเล็กน้อยตามวิธีของ Myers และ Slater (39) โดยขณะทำการเตรียมและตลอดระยะเวลาทำปฏิบัติการต้องแช่ตับ และไมโตคอนเดรียในภาชนะบรรจุน้ำแข็ง (ice bath) ส่วนอุณหภูมิของเครื่องปั่นแยกไมโตคอนเดรีย (refrigerated centrifuge) ให้ตั้งไว้ที่ 4°C ทั้งนี้เพื่อให้ได้ไมโตคอนเดรียที่เป็น intact mitochondria

สารละลายที่ใช้เป็น medium ในการเตรียมมี 2 ชนิด คือ

- สารละลาย A ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2)
- สารละลาย B ประกอบด้วย 0.25 M sucrose เพียงอย่างเดียว

I17386903X

ขั้นตอนการเตรียมแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

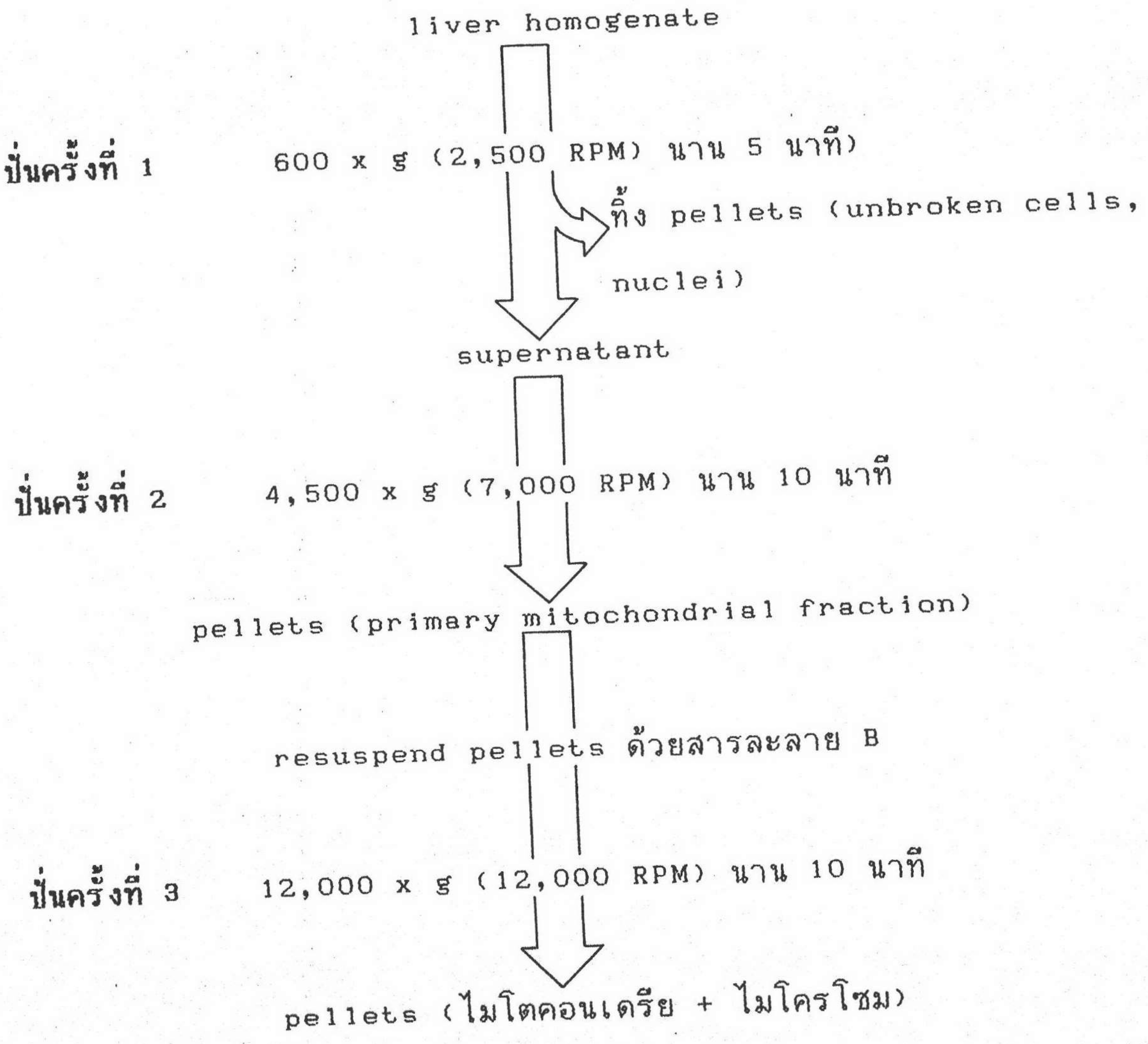
ขั้นตอนที่ 2 การเตรียม liver mitochondria

ขั้นตอนที่ 1

ทำให้หนูตายทันทีโดยการตีหัวบริเวณท้ายทอย และทำ cervical dislocation เปิดช่องท้องหนูแล้วตัดตับออกจากตัวหนู นำตับที่ได้แช่ล้างในสารละลาย A หลาย ๆ ครั้งจนหมดเลือด แล้วนำตับแช่ในสารละลาย A ประมาณ 70-80 มล. ตัดตับด้วยกรรไกรจนได้ชิ้นตับเล็กประมาณ 0.3-0.5 ซม. ล้างเลือดอีกครั้งด้วยสารละลายเดิม จากนั้นนำไป homogenize ด้วย tissue grinder ปริมาตร 30 มล. (ทำ 2 ครั้ง) เพื่อให้เซลล์ตับแตก จะได้ liver homogenate ประมาณ 70 มล. ต่อหนู 1 ตัว

ขั้นตอนที่ 2

นำ liver homogenate ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาปั่นแยก (centrifuge) ให้ได้ไมโตคอนเดรีย โดยใช้ Hitachi high speed refrigerated centrifuge Himac CR 20 B3, rotor no.9 ปั่นทั้งหมด 3 ครั้ง ตามแผนภูมิต่อไปนี้



pellets ที่ได้จากการปั่นครั้งที่ 3 จะเห็นแยกเป็น 2 ชั้นชัดเจนในหลอด centrifuge โดยชั้นบนเป็นไมโครโซม (microsome) เป็นสีชมพูอ่อนและเกาะกันอย่างหลวม ๆ ส่วนชั้นล่างเป็นไมโตคอนเดรียเห็นเป็นสีน้ำตาลและเกาะกันแน่น การแยกไมโครโซมออกทำโดยเท supernatant ทิ้งแล้วเติมสารละลาย B ประมาณ 1-2 มล. เขย่าหลอด centrifuge เบาๆ ชั้นไมโครโซมก็จะหลุดออก จากนั้นใช้ dropper ดูดชั้นไมโครโซมทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้งจนกว่าไมโครโซมหลุดออกหมด เหลือแต่ชั้นไมโตคอนเดรีย จากนั้นให้เติมสารละลาย B ประมาณ 2 -3 มล. เพื่อ resuspend ไมโตคอนเดรีย และ

homogenize ใน tissue grinder ปริมาตร 10 มล. ด้วยมือเบา ๆ ให้เข้ากันดีจนได้สารแขวนตะกอนของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial suspension)

Mitochondrial suspension ที่เหมาะสำหรับใช้ในการวิจัยควรมีปริมาณไมโตคอนเดรีย คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อมิลลิลิตร อยู่ในช่วง 30-60 มก./มล. และถ้าใช้ glutamate + malate เป็น substrate ในการหาค่า RCI ที่อุณหภูมิ 37°C ควรมีค่า RCI ประมาณ 5-8

การเตรียม osmotic-shocked mitochondria

ทำโดยนำ mitochondrial pellet ที่เตรียมได้จากการปั่นครั้งที่ 3 ดังวิธีข้างต้นมา resuspend ในสารละลาย 0.025 M sucrose ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมี magnetic stirror หมุนกวนช้า ๆ ให้ suspension เข้ากันตลอดเวลา จากนั้นให้นำ osmotic-shocked mitochondria ที่ได้เก็บในภาชนะแช่น้ำแข็ง (ice bath) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

Incubation medium

Incubation medium ที่ใช้ในการวิจัยแบ่งตามสภาวะการทดลองได้ดังนี้

1. Incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย ซึ่งใช้มากที่สุดในการวิจัยนี้ประกอบด้วย HEPES buffer (pH 7.2) 40 mM, $MgCl_2$ 2 mM และ KCl 92 mM มีคุณสมบัติเป็น isotonic buffer โดยมีความเข้มข้น รวม 250 milli Osmolar

2. Incubation medium ที่ใช้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลง pH ใน medium จะมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับใน incubation medium ในข้อ 1 แต่ปรับ pH ของ HEPES buffer เป็น 6.8, 7.2 และ 7.6

3. Hypotonic incubation medium สำหรับวัดอัตราการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria ประกอบด้วย HEPES buffer (pH 7.2) 40 mM, $MgCl_2$ 2mM และ KCl 29.5 mM.

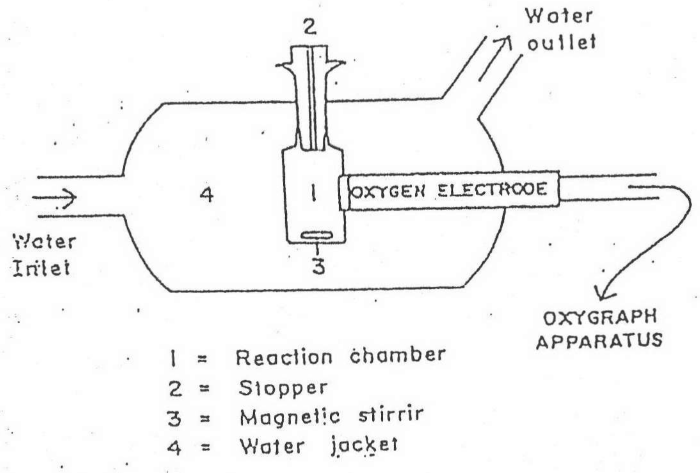
4. Low-buffering incubation medium สำหรับวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ประกอบด้วย HEPES buffer (pH 7.2) 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM และ KCl 118 mM.

5. Incubation medium สำหรับศึกษาการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมโดยไมโตคอนเดรีย จะมีส่วนประกอบเหมือน incubation medium ในข้อ 1 แต่เพิ่ม inorganic phosphate (KH_2PO_4) ลงไป 1 mM.

6. Incubation medium สำหรับศึกษาการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (monoamine oxidase, MAO) ประกอบด้วย inorganic phosphate (KH_2PO_4) buffer (pH 7.2) 0.025 M.

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ใช้เทคนิคโพลาโรกราฟฟิค ออกซิเจน อิเลคโทรด (polarographic oxygen electrode)(40, 41) ซึ่งทำใน Gilson reaction chamber (รูปที่ 11) โดย chamber มีความจุประมาณ 2 มล. ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น มีฝาจุกปิด (stopper) ซึ่งตรงกลางของฝามีรูกลวงใช้ในการเติม substrate และ reagents ต่าง ๆ เข้าสู่ chamber ขณะที่ทำการทดลองต้องปิดฝาจุกเพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนนอก chamber รบกวนปริมาณออกซิเจนใน chamber ซึ่งอาจทำให้ผลวิจัยผิดพลาดได้ เราสามารถวัดอัตราการลดลงของปริมาณออกซิเจนใน chamber ขณะที่



รูปที่ 11 แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor + recorder)

ไมโตคอนเดรียมีการหายใจ (หรือใช้ออกซิเจน) โดยใช้ Clark oxygen electrode ต่อเข้ากับ amplifier (YSI model 53) และบันทึกผลโดย Gilson recorder ได้เป็น tracing บนกระดาษกราฟแสดงอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย และเรียก tracing นี้ว่า oxygen electrode tracing (หรือ polarographic tracing, oxygraph tracing)

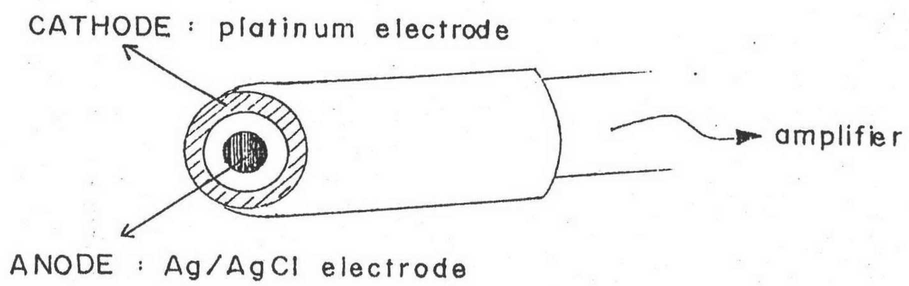
ในขณะที่ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับ reagents ต่าง ๆ ใน chamber อยู่นั้น จะมี magnetic stirror ขนาดเล็กช่วยหมุนให้สารละลายใน chamber เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และสัมผัสกับ clark oxygen electrode ได้ทั่วถึง นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมอุณหภูมิในขณะทำการทดลองให้คงที่ ที่ 37°C โดยการทำให้น้ำที่ปรับอุณหภูมิไว้คงที่ตลอดเวลา ไหลผ่านตามท่อระบายน้ำ เข้าออกของ chamber (water inlet and outlet) ดังรูปที่ 11

เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาปริมาณออกซิเจนใน chamber จะคงที่ที่ระดับ 100% saturation แต่เมื่อไมโตคอนเดรียมีการหายใจปริมาณออกซิเจนใน chamber จะค่อย ๆ ลดลง และเราวัดอัตราการลดของออกซิเจนใน chamber ได้ด้วย Clark oxygen electrode ซึ่งประกอบด้วย electrode 2 ชนิดรวมกัน คือ Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode ล้อมรอบด้วย platinum electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้ว cathode (ดังรูปที่ 12) โดยมี half saturated KCl solution ฉาบผิวขั้ว electrode ทั้งสอง ทำหน้าที่เป็น salt bridge และมี YSI membrane (standard type) หุ้มปิดที่ขั้วของ electrode โดย membrane ชนิดนี้ยอมให้เฉพาะออกซิเจนผ่านเท่านั้น

ปฏิกิริยาที่เกิดที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ

Anode : $4\ Ag + 4\ Cl^- \longrightarrow 4\ AgCl + 4e^-$

Cathode : $4\ H^+ + 4e^+ + O_2 \longrightarrow 2\ H_2O$



รูปที่ 12 แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว cathode

ปกติระหว่างขั้วทั้งสองจะมี polarizing voltage 0.8 V เมื่อทำปฏิกิริยาดังสมการข้างต้น จะมีการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่าง 2 ขั้วเกิดขึ้น และกระแสที่เกิดนี้จะถูกส่งไปยัง amplifier ซึ่งทำหน้าที่ขยายกระแสเข้าสู่ Gilson recorder บันทึกเป็น tracing ต่อไป ปริมาณกระแสจะแปรผันตามปริมาณออกซิเจนใน chamber ทำให้สามารถวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้

สำหรับการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนใน การออกซิไดส์สารโมโนเอมีนของไมโตคอนเดรีย (ศึกษาการทำงานของ MAO ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นนอกของไมโต-คอนเดรีย) นั้นทำเช่นเดียวกับการวัดอัตราการหายใจ แต่ปฏิกิริยาที่เกิดโดย MAO คือ oxidative deamination ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$R - CH_2 - NH_2 + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{MAO}} R - CHO + NH_3 + H_2O$$

ในการวิจัยนี้ใช้ benzylamine เป็น monoamine substrate ส่วน incubation medium ใช้ phosphate buffer pH 7.2 และต้องเติม respiratory chain inhibitor (ในที่นี้ใช้ rotenone) เพื่อยับยั้งการออกซิไดส์ endogenous substrate ของไมโตคอนเดรียเอง จึงจะแปรผลได้ว่าการใช้ออกซิเจนที่เกิดขึ้นเป็นการออกซิไดส์ benzylamine เพียงอย่างเดียว และทำให้ทราบ activity ของ MAO ได้

การแบ่งภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโตคอนเดรีย มีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจน, substrate, ADP + Pi หรือการมี

uncoupler หรือไม่ เป็นต้น นักวิจัยจึงจัดแบ่งภาวะต่าง ๆ ของการหายใจของไมโตคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญข้างต้น ดังที่ Chances and William (42) ได้จัดแบ่งภาวะของการหายใจของไมโตคอนเดรีย ออกเป็น 6 ภาวะ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 : แสดงการแบ่งภาวะ (states) ต่าง ๆ ของการหายใจของไมโตคอนเดรีย

state	condition
1	มีเพียง O_2
2	มี O_2 และ ADP
3	มี O_2 , ADP และ substrate
3u	มี uncoupler
4	มี O_2 และ substrate
5	มีเพียง substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess Ca^{2+}

การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ, อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

1. **การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index, RCI)**

นอกจาก Chances and William (42) จะแบ่งภาวะ (states) การหายใจของไมโตคอนเดรีย ออกเป็น 6 ภาวะดังที่กล่าวมาแล้ว

ยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการออกซิเดชั่นกับกระบวนการฟอสฟอริเลชั่น ค่า RCI นี้บอกถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี คือเป็น intact mitochondria หรือไม่ การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้

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

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

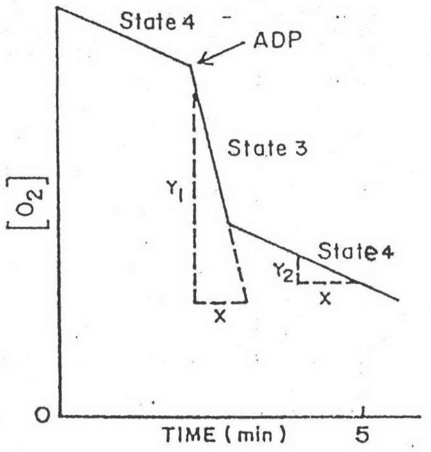
จาก oxygraph tracing (ในรูปที่ 13) การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน x ของทั้ง 2 states ยาวเท่ากัน ดังนั้นค่า $RCI = \frac{Y_1}{Y_2}$

2. **การคำนวณค่า ADP/O**

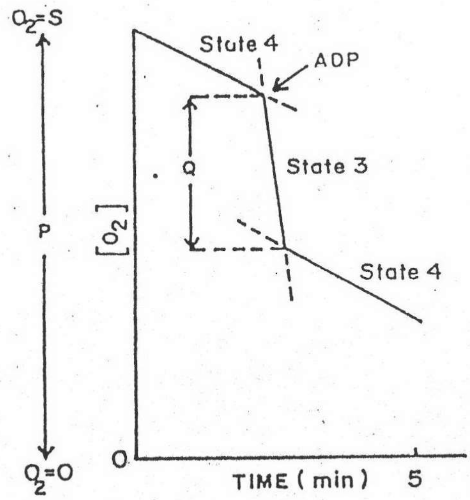
ADP/O คือ อัตราส่วนระหว่าง มคม. ของ ADP ที่ใช้ในการสร้าง ATP ต่อจำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่นำมาใช้สร้าง ATP หรืออาจกล่าวว่าเมื่อไมโตคอนเดรียรับเอาออกซิเจน 1 อะตอม (1/2 O_2) เข้าไปจะเกิดการสร้าง ATP ได้กี่โมเลกุล

Estabrook (43) ได้แสดงวิธีคำนวณค่า ADP/O จากการทำปฏิกิริยาดังนี้

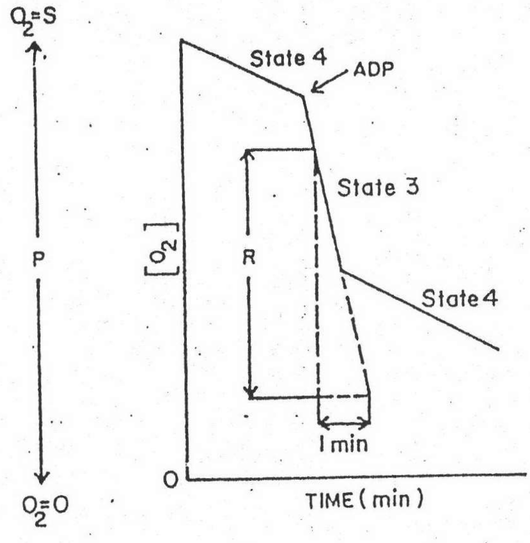
$$ADP/O = \frac{\text{จำนวน มคม.ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา}}{\text{จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3}}$$



รูปที่ 13 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 14 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน ADP/O



รูปที่ 15 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

จำนวน มคม.ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยานั้น คำนวณจากความเข้มข้นและปริมาตรของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา ส่วนจำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ใช้ระหว่างการเกิด state 3 คำนวณจาก oxygraph tracing ดังตัวอย่างในรูปที่ 14 จะได้ว่า

จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ใช้ระหว่างเกิด state 3 = $\left[\frac{Q}{P}\right] \times S$

โดย P = ความสูงของเส้น P ในรูป

Q = ความสูงของเส้น Q ในรูป

S = จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัว (saturate) อยู่ในระบบปฏิกิริยาก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียนำไปใช้

ค่า S ขึ้นกับปริมาตรของระบบขณะเกิดปฏิกิริยาใน chamber และยังขึ้นกับอุณหภูมิขณะเกิดปฏิกิริยาด้วย คือ ถ้าปริมาตรของระบบใน chamber มาก ปริมาณออกซิเจนที่ละลายก็มีมาก แต่ถ้าอุณหภูมิของระบบสูงออกซิเจนจะละลาย chamber ได้ลดลง ส่วนการคำนวณค่า s ทำโดยนำค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในระบบปฏิกิริยา 1 มล. (A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของระบบปฏิกิริยาใน chamber โดย

$$A = \left[\frac{s}{V}\right]\left[\frac{P}{100}\right] \times N \times 10^{6} \quad \text{มคอ.ออกซิเจน/มล.}$$

เมื่อ A = จำนวน มคอ. ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 มล.

s = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิ 37°C

= 0.02373

P = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ

= 21 %

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน

= 2

V = ปริมาตรก๊าซที่ 0°C ความดัน 1 บรรยากาศ ปริมาณ 1 กรัมโมล

= 22,400 มล.

แทนค่าทั้งหมดลงในสมการข้างบน จะได้ค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 มล. (A) ที่อุณหภูมิ 37°C เท่ากับ 0.4449 มคอ. ออกซิเจน/มล.

3. **การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจน** (หรืออัตราการหายใจ) ของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ

ตัวอย่าง จาก oxygraph tracing รูปที่ 15 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโตคอนเดรีย ได้ดังนี้

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = $\frac{R}{P} \times S$ มคอ.ออกซิเจน/นาที

เมื่อ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน มคอ. ออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในปฏิกิริยาก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียนำไปใช้

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนทั้งหมดของไมโตคอนเดรีย (หน่วยเป็น มก.) ที่ใช้ทำปฏิกิริยา แล้วนำค่านี้ไปหารค่าอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้จากสมการข้างบน จะได้อัตราการใช้ออกซิเจนที่มีหน่วยเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/นาที/มก. โปรตีน และถ้าทราบปริมาตรทั้งหมดของระบบปฏิกิริยา (หน่วยเป็น มล.) ใน chamber เมื่อนำค่านี้ไปหารก็จะได้อัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียที่มีหน่วนเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน/มล. นอกจากนี้เราสามารถแปลงหน่วยให้เป็นจำนวน นนอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน/มล.

การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ ATP จะเกิดผลิตผล คือ ADP, Pi และ H^+ ดังสมการต่อไปนี้

$$ATP + H_2O \underset{}{\overset{ATPsynthase\ (F_1F_o\ ATPase)}{\rightleftharpoons}} ADP + Pi + H^+$$

การวัด ATPase activity กระทำได้ 2 วิธี วิธีแรก คือ การวัดปริมาณ inorganic phosphate (Pi) (44) ส่วนวิธีที่สอง คือ การวัดปริมาณโปรตอน (H^+) (45) ซึ่งถูกปลดปล่อยจากการไฮโดรไลส์ ATP เช่นกัน

ในการวิจัยครั้งนี้ทำตามวิธีหลัง คือ วัดปริมาณ H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน incubation medium หลังเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ pH electrode ซึ่งต่อเข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) และสัญญาณจากเครื่อง pH meter นี้ต่อเข้ากับ Gilson recorder เพื่อให้ได้ tracing บันทึกการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium

ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

1. ใส่ low-buffering incubation medium 3 มล. และไมโตคอนเดรีย 200 มคล. ลงในบีกเกอร์ขนาด 5-10 มล. ซึ่งมี magnetic stirrer หมุนกวนที่ก้นบีกเกอร์ตลอดเวลา

2. เติม 0.05 M DNP 5 มคล. เพื่อกระตุ้นการทำงานของ ATPase

3. เติม gemfibrozil ในความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบลงไป incubate นาน 1 นาที

4. เติม ATP 4.5 mM ลงไป สังเกตผลการทดลองโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ absolute ethanol (ตัวทำละลาย gemfibrozil) แทน นอกจากนี้ยังต้องเปรียบเทียบกับ oligomycin ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ ATPase ด้วย

การวัดการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมโดยไมโตคอนเดรีย

ทำโดยใช้ calcium-selective electrode (Orion model 93-20) ร่วมกับ reference electrode (Orion model 90-02) วัดปริมาณแคลเซียมใน incubation medium ที่เปลี่ยนแปลงไปจากการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรียและบันทึกผลเป็น tracing โดย electrode ทั้งสองจะต่อเข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) ซึ่งจะต่อกับ Gilson recorder อีกครั้งหนึ่ง

ขั้นตอนการวัดผลการสะสมแคลเซียม ทำดังนี้

1. ใส่ incubation medium 3 มล. และ substrate ลงใน beaker

2. เติม gemfibrozil ในความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบลงไปรอจน baseline คงที่

3. เติม $CaCl_2$ 0.12 mM ลงไปและรอนานประมาณ 2 นาที เพื่อให้ได้ stable tracing

4. เติมไมโตคอนเดรีย 200 มคล. ลงไป สังเกตผลเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มี gemfibrozil

ขั้นตอนการวัดผลการปลดปล่อยแคลเซียม ทำดังนี้

1. ใส่ incubation medium 3 มล. และ substrate ลงใน beaker

2. เติม $CaCl_2$ 0.12 mM และรอประมาณ 2 นาที

3. เติมไมโตคอนเดรีย 200 มคล. incubate นาน 5 นาที เพื่อให้ไมโตคอนเดรียสะสมแคลเซียมไว้จนคงที่

4. เติม gemfibrozil ลงไปสังเกตผลว่า gemfibrozil กระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโตคอนเดรียหรือไม่โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มี gemfibrozil และกลุ่มที่ใช้ DNP (DNP มีคุณสมบัติกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียม)

การวัด activity ของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (MAO)

ทำโดยวัดอัตราการใช้ออกซิเจนเช่นเดียวกับการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียซึ่งทำใน Gilson reaction chamber เนื่องจาก MAO เป็นเอนไซม์ที่ออกซิไดส์สารโมโนเอมีนและต้องใช้ออกซิเจนเช่นกัน

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

อัตราการหายใจหรือ activity ต่าง ๆ ของไมโตคอนเดรีย นอกจากจะขึ้นกับองค์ประกอบต่าง ๆ เช่น ปริมาณ substrate, ปริมาณออกซิเจน และ ADP + Pi ใน incubation medium แล้วยังขึ้นกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ mitochondrial suspension ที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง ดังนั้นจึงต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียเพื่อให้ผลวิจัยที่ได้มีหน่วยของอัตราการหายใจและ activity อื่น ๆ เป็นมาตรฐานเดียวกัน

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในที่นี้ทำตามวิธีของ Lowry และคณะ (46) และ Miller และคณะ (47) โดยมีหลักการคือให้โปรตีนของไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ($CuSO_4$) เกิดเป็นสาร

ประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงินแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Ultraspec II) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งมี bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

สารเคมีที่สำคัญที่ใช้มี 2 ชนิดคือ

1. Alkaline-copper reagent

ประกอบด้วย 0.5% $CuSO_4$ ที่ละลายในสารละลาย 1% w/v ของ potassium tartrate และ 10% ของ Na_2CO_3 ที่ละลายในสารละลาย 0.5 M NaOH (อัตราส่วน 1:10 v/v)

2. Folin & Ciocalteu's phenol reagent

สารละลายเจือจางของ Folin & Ciocalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:10 v/v) ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง ที่ทำการหาปริมาณโปรตีน

ขั้นตอนการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย ทำดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:300

2. นำไมโตคอนเดรียจากข้อ 1 ปริมาตร 1 มล. มาเติม alkaline-copper reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที ในกรณี blank ให้ใช้น้ำกลั่นแทนไมโตคอนเดรีย ส่วน standard curve ให้ใช้ standard BSA ในความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มก./มล. แทน

3. เติม Folin & Ciocalteu's phenol reagent ที่เจือจางแล้วปริมาตร 3 มล. ลงในข้อ 2 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ใน water bath

ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 50°C นาน 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ blank เป็นตัวเปรียบเทียบ

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ของ BSA

6. นำค่าที่ได้จากข้อ 6 คูณกับ dilution factor 300 จะได้ค่าปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย หน่วยเป็น มก./มล.

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัยและแหล่งที่มาของสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

ในที่นี้จะแยกประเภทของสารเคมีที่เตรียมขึ้นตามชนิดของตัวทำละลายซึ่งโดยทั่วไป ตัวทำละลายที่ใช้บ่อยที่สุดคือ น้ำกลั่น 3 ครั้ง ส่วนสารเคมีที่ละลายได้น้อยหรือไม่ละลายในน้ำ ก็อาจละลายใน absolute ethanol หรืออาจใช้ dimethylsulfoxide (DMSO) ละลายได้ ดังนั้นจึงแบ่งชนิดของสารเคมีที่ใช้ทำวิจัยเป็น 3 ประเภทดังนี้

1.1 สารเคมีที่ละลายในน้ำ ได้แก่

1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล.

1 M succinate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล.

0.8 M ascorbate + 0.2 M TMPD (pH 7.2) ขนาด 5 มคล.

1 M α-ketoglutate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล.

1 M β-hydroxybutyrate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล.

0.2 M NADH ใน 1% $NaHCO_3$ ขนาด 10 มคล.

0.3 M ADP + 0.6 M Pi ขนาด 2 มคล.

0.05 M DNP ขนาด 2-5 มคล.

1 M HEPES buffer pH 6.8, 7.2 และ 7.6

0.05 M $MgCl_2$

2.3 M KCl

1 mM EGTA pH 7.2

0.1 M ATP (pH 7.2) ขนาด 150 มคล.

1 M DTT ขนาด 2 มคล.

0.025 M และ 0.25 M sucrose

bovine serum albumin (BSA) 250 มก./มล.
ขนาด 20-120 มคล.

0.1 M benzylamine ขนาด 2 มคล.

0.025 M potassium phosphate (KH_2PO_4)

0.2 M H_2SO_4 ขนาด 1.5 มคล.

0.1 M pargyline ขนาด 1 มคล.

0.2 M calcium chloride ขนาด 2 มคล.

0.1 M calcium chloride

การปรับ pH ของสารทำได้โดยใช้สารละลายของ KOH และ HCl ในน้ำกลั่น 3 ครั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

1.2 สารเคมีที่ละลายใน absolute ethanol ได้แก่

5 มก./มล. oligomycin ขนาด 1 มคล.

20 mM, 40 mM และ 80 mM gemfibrozil ขนาด 1-5 มคล.

40 mM และ 80 mM clofibric acid ขนาด 1-5 มคล.

1.3 สารเคมีที่ละลายใน DMSO คือ 5 มก./มล. rotenone ขนาด 2 มคล.

2. แหล่งที่มาของสารเคมี

บริษัท Sigma chemical : L-glutamic acid, malic acid, succinic acid, ascorbic acid, TMPD, ADP, potassium phosphate (KH_2PO_4), KCl, DNP, $CaCl_2$ benzylamine, pargyline, DTT, bovine serum albumin, α-ketoglutaric acid, DL-β-hydroxybutyric acid, sucrose, EGTA, HEPES buffer, $MgCl_2$, oligomycin, gemfibrozil, clofibric acid, rotenone, DMSO, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, $CuSO_4$, NaOH

บริษัท Analytical Carlo Erba:potassium tartrate

บริษัท Riedal-De Hean AG Seelze-Haunover : absolute alcohol

บริษัท E.Merck, Darmstadt : absolute ethanol, sodium carbonate, sulfuric acid, sucrose (saccharose), hydrochloric acid, potassium hydroxide

การแสดงผลวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. Oxygraph tracings

คัดลอกจาก oxygraph tracings ของผลการทดลอง โดยแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในหน่วย จำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำโดยใช้สถิติวิเคราะห์แบบ two-tailed paired student's t-test ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง