บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200 – 250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม และทำการพักสัตว์ทดลองก่อนนำมาทำการทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองได้ปรับสภาพร่างกาย ในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งควบคุมอุณหภูมิห้องให้อยู่ระหว่าง 25 ± 2°C มีแสงสว่างพอเหมาะ จัดให้มีช่วงมืดและช่วงสว่างอย่างละ 12 ชั่วโมงสลับกันใน 1 วัน มีระบบระบายอากาศ และเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงพลาสติกใส (polycarbonate) ที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด ฝากรงทำจากลวดเหล็กไร้สนิม มีสัตว์ทดลองจำนวน 3 ตัวในแต่ละกรง โดยเลี้ยงดูสัตว์ทดลองด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และมีน้ำสะอาดให้เพียงพอตามความต้องการของสัตว์ทดลอง (*ad libitum*)

หมายเหตุ : จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในแต่ละสภาวะการทดลองจะมีจำนวน 4 ตัว ต่อ 1 สภาวะการทดลอง (n = 4) โดยหนูขาว 1 ตัวเมื่อเตรียมได้ไมโตคอนเดรียแล้วจะนำมาทดสอบกับสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ control คือ การเติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารทดสอบภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน

1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Heidolph motor drive tissue homogenizer (Type 50203 RZR 2)
2. Thomas glass homogenizer tube with teflon pestle
3. pH- meter
4. Hitachi automatic high speed refrigerated centrifuge, Himac model CR20B3, Rotor model RPR 18-3
5. Oxygraph

   Gilson Oxygen chamber

   Clark Oxygen Electrode

YSI 5775 oxygen probe service kit (Clark-type membrane booklets (Std.), O_2 probe solution : half saturated KCl solution, O-rings)

Biological Oxygen Monitor (YSI Model 53)

Strip chart recorder (Gilson recorder model N2)

6. Temperature controlled circulator water bath
7. UV / Visible recording spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu)
8. Autometric pipette ขนาด 200, 1,000 และ 5,000 µl (Gilson, France)
9. Hamilton microsyringe ขนาด 25 µl
10. Vortex mixer (Velp Scientifica, Europe)
11. Shaker bath (Hetofrig, Danmark)

1.3 สารเคมี

แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

<u>สารทดสอบ</u>

ฟลาโวนอยด์ quercetin และ naringenin จากบริษัท Sigma Chemical

<u>สารเคมีอื่นๆ</u>

- สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical ได้แก่ adenosine 5′-diphosphate (ADP), adenosine 5′- triphosphate (ATP), 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, ammonium molybdate, ascorbic acid, benzylamine hydrochloride, bovine serum albumin (BSA), cupric sulfate ($CuSO_4$), dimethylsulfoxide (DMSO), 2,4-dinitrophenol (DNP), EDTA, EGTA, ferrous sulphate($FeSO_4$), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, HEPES, 5-hydroxytryptamine (5-HT), L-glutamic acid, magnesium chloride ($MgCl_2$), malic acid, oligomycin, potassium chloride (KCl), potassium phosphate monobasic anhydrous (KH_2PO_4), rotenone, sodium bisulfate, sodium hydroxide (NaOH), sodium phosphate dibasic anhydrous, sodium phosphate monobasic, sodium potassium tartrate, sodium sulfite, succinic acid, sucrose, trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid, tyramine hydrochloride

- สารเคมีจากบริษัท E. Merck ได้แก่ absolute ethanol, sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3), sulfuric acid (H_2SO_4), hydrochloric acid (HCl), potassium hydroxide (KOH)

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นและปริมาณที่ใช้บ่อยของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) ได้แก่ 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ใช้ 2 µl, 0.1 M ATP ใช้ 150 µl, 0.05 – 0.30 mg/ml BSA, 0.05 M DNP ใช้ 2 µl, EDTA, EGTA, 40 mM HEPES buffer (pH 7.2), 0.1 M 5-HT ใช้ 10 µl, 2.5% w/v ammonium molybdate, 2%w/v ascorbic acid ใช้ 10 µl, 0.1 M benzylamine hydrochloride ใช้ 10 µl, 1mM $FeSO_4$ ใช้ 10 µl, 1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) ใช้ 10 µl, 0.5 M NaOH, 1 M succinate (pH 7.2) ใช้ 10 µl, 2 mM $MgCl_2$, 92 mM KCl, KH_2PO_4, H_2SO_4, 0.25 M sucrose, 20% w/v trichloroacetic acid, 0.5% w/v thiobarbituric acid และ 0.1 M tyramine hydrochloride ใช้ 10 µl

สารเคมีที่ละลายใน DMSO ได้แก่ สารทดสอบ naringenin และ quercetin ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณที่ใช้ครั้งละ 10 µl

สารเคมีที่ละลายใน absolute ethanol ได้แก่ 5mg/ml oligomycin ปริมาณที่ใช้ครั้งละ 2 µl และ 5 mg/ml rotenone ปริมาณที่ใช้ครั้งละ 2 µl

ในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการจะใช้สารละลาย 0.5 N, 1 N KOH และ สารละลาย 0.5 N, 1 N HCl

2.2 การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจ และศึกษาผลของสารต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย

ประกอบด้วย :	HEPES buffer, pH 7.2	40	mM (60 mOsm)
	$MgCl_2$	2	mM (6 mOsm)
	KCl	92	mM (184 mOsm)

(เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsm)

ซึ่งเตรียมได้จาก	HEPES buffer, pH 7.2	1	M ปริมาณ 2 ml
	$MgCl_2$	0.05	M ปริมาณ 2 ml
	KCl	2.3	M ปริมาณ 2 ml

นำมาผสมรวมกัน และปรับปริมาตรด้วย ultrapure water จนครบ 50 ml จะได้เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsm ปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2

2.2.2 incubation medium สำหรับการศึกษาผลของสารต่อการทำงานของ

เอนไซม์ monoamine oxidase ของไมโตคอนเดรีย คือ 0.025 M inorganic phosphate buffer (KH_2PO_4), pH 7.2

2.2.3 incubation medium สำหรับการศึกษา lipid peroxidation คือ 0.05 M inorganic phosphate buffer (KH_2PO_4), pH 7.2

2.3 การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว

2.3.1 การเตรียม mitochondrial suspension

เตรียมโดยใช้วิธี Differential centrifugation ตามวิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myer และ Slater (1957) เป็นผู้ดัดแปลงวิธีเล็กน้อย ทำการปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate ของหนูขาวโดยใช้ refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมไว้ที่ 4 °C โดยขั้นตอนการเตรียมไมโตคอนเดรีย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

1. นำสลบหนูขาวด้วย ether แล้วทำ cervical dislocation จากนั้นผ่าตัดเปิดหน้าท้อง เทราดตับและช่องท้องด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่เย็นจัด ประมาณ 100 ml แล้วรีบตัดตับออกมาล้างทันทีด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่เย็นจัด ประมาณ 50 ml และล้างต่อด้วย homogenizing medium (ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2)) ที่เย็นจัด ล้างหลายๆ ครั้งจนหมดคราบเลือด แช่ตับใน homogenizing medium ปริมาตรประมาณ 60 - 70 ml

2. ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกร ล้างล้มเลือดอีกครั้งโดยใช้สารละลาย homogenizing medium หลังจากนั้นนำชิ้นตับเล็กๆที่แช่ใน homogenizing medium เทแบ่งใส่หลอด Thomas glass homogenizer ที่แช่เย็นจัด แล้วทำการ homogenize ด้วยเครื่อง Heidolph motor drive tissue homogenizer Type 50203 RZR2 นาน 2 – 3 นาที (6 -7 ครั้ง) จนกระทั่งได้ liver homogenate ปริมาตรประมาณ 60 - 80 ml นำมาเทใส่หลอด centrifuge เพื่อนำไปปั่นแยกต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยก (centrifuge) ไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่บรรจุอยู่ในหลอด centrifuge มาปั่นแยกเพื่อให้ได้ไมโตคอนเดรีย โดยใช้เครื่อง Hitachi Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge Himac model CR 20B3 และใช้ rotor model RPR 18-3 ทำการปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้ (รูปที่ 19)

ครั้งที่ 1 : นำ liver homogenate มาปั่นแยกที่ 600 x *g* (2,500 rpm) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็น supernatant ใส่ในหลอด centrifugeใหม่ สำหรับส่วนที่เป็น pellets ให้ทิ้งไป

หมายเหตุ : ส่วนที่เป็น supernatant ที่ได้คือ mitochondria, microsome

ส่วนที่เป็น pellets จะประกอบด้วย nuclei, red blood cells, cell wall, unbroken cells

ครั้งที่ 2 : นำส่วนที่เป็น supernatant มาปั่นแยกต่อที่ 4,500 x *g* (7,000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้รินแยก supernatant fluid ทิ้งไป เอาเฉพาะส่วน pellets มา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ที่แช่เย็น ทำการ homogenize ด้วยมือโดยใช้ glass homogenizer เพื่อให้ตะกอนของไมโตคอนเดรียกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน

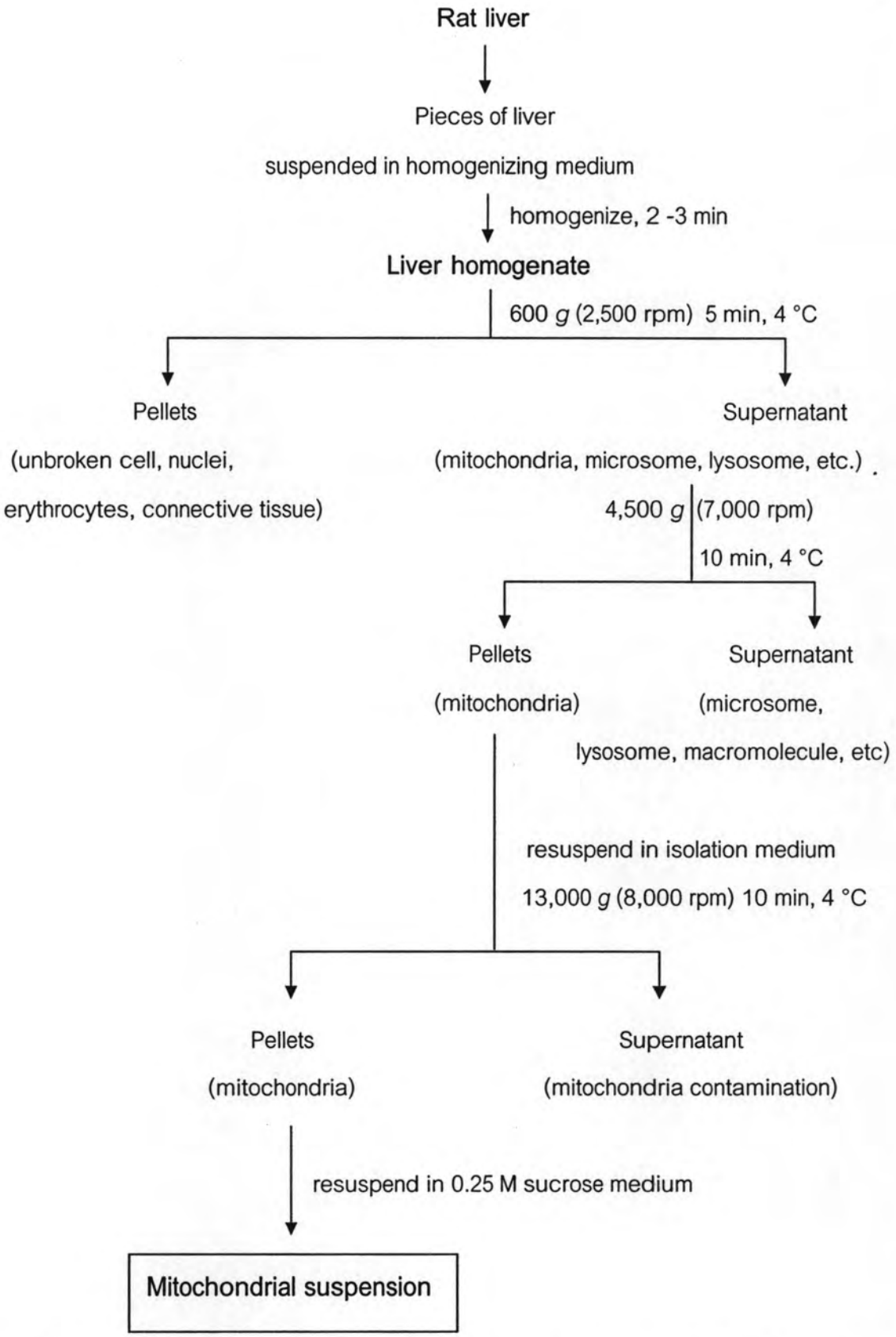
ครั้งที่ 3 : นำมาปั่นแยกต่อที่ 13,000 x *g* (8,000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้รินส่วน supernatant fluid ทิ้งไป ส่วนของ pellets นั้นจะมีชั้นของ microsome สีชมพูเกาะกันอย่างหลวมๆอยู่ชั้นบนของตะกอน กำจัดออกโดยใช้ 0.25 M sucrose ที่แช่เย็นใส่ลงไปเล็กน้อย แล้วค่อยๆเทออกด้วยความระมัดระวัง ทำซ้ำจนกระทั่งชั้นของไมโครโซมเหลือน้อยที่สุด ส่วนชั้นล่างที่มีสีน้ำตาลอ่อนและเกาะกันแน่น คือ ชั้นของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial pellets) จากนั้นทำการ resuspend ตะกอนไมโตคอนเดรียด้วย 0.25 M sucrose ที่แช่เย็นประมาณ 2 - 3 ml แล้ว homogenize เบาๆด้วยมือ จะได้ mitochondrial suspension โดยเก็บในภาชนะแช่น้ำแข็ง (ice - bath) ตลอดการทดลอง

หมายเหตุ : ไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการวิจัยจะต้องมีค่า RCI (respiratory control index) มากกว่า 4

2.3.2 การเตรียมไมโตคอนเดรีย เพื่อศึกษา lipid peroxidation

นำ mitochondrial pellets ที่เตรียมได้จากการปั่นแยกครั้งที่ 3 ข้างต้น มาล้างด้วยสารละลาย 1.1% KCl 2 ครั้ง ก่อนที่จะ resuspend ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer, pH 7.2 แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง (ice - bath) สำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

I 23466807



รูปที่ 19 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้วิธี differential centrifugation (Hogeboom, 1955; Myers และ Slater, 1957; Sordahl, 1971)

2.4 การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

ปริมาณไมโตคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้จากตับหนูขาว สำหรับใช้ในการทดลองในแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาปริมาณหรือความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในการทดลองนี้ 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 (UV-160A, Shimadzu) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นมาตรฐาน

ขั้นตอนการปฏิบัติการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

1. เจือจาง mitochondrial suspension ปริมาณ 10 µl ด้วยน้ำกลั่น 3 ml (1:300) จะได้สารละลาย A

2. ดูดสารละลาย A ปริมาณ 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม alkaline copper reducing agent 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
(กรณีเป็น blank จะใช้น้ำกลั่น 1 ml ส่วนในกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1 ml ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/ml แทนสารละลาย A)

3. เติม Folin - Phenol reagent (dilution 1:10) 3 ml เขย่าให้เข้ากัน

4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลานาน 10 นาที

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 100) จะได้ค่าความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย หน่วยเป็น mg/ml

หมายเหตุ : การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน

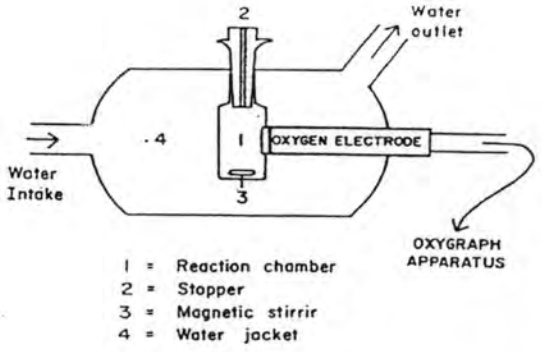
- Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วน ของ 0.5% $CuSO_4$ ที่ละลายอยู่ใน 1% (w/v) ของ potassium tartrate และ 10 ส่วน ของ 10% Na_2CO_3 ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH

- Folin - Phenol reagent (1:10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin & Ciocalteu's Phenol reagent ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:10 (v/v) และ เตรียมใช้ทันที

การศึกษาผลของสารต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่าง ๆของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ water jacketed chamber (Gilson reaction chamber) ซึ่งมีความจุประมาณ 2.0 ml ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น และมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรูสำหรับเติมสารต่างๆลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรียใน reaction chamber สามารถติดตามดูอัตราการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนด้วย Clark oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับ reaction mixture ใน chamber และ สัญญาณการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนใน reaction mixture ที่วัดได้โดย oxygen electrode จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor ซึ่งมีหน้าปัทม์บอกปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ขณะนั้นๆ แล้วบันทึกอัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนด้วย Gilson recorder (model N2) สามารถบันทึกผลที่ได้ออกมาบนกระดาษบันทึก ในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนในสภาวะต่างๆ เรียกว่า oxygen-electrode tracing (polarographic tracing หรือ oxygraph tracing) โดยในระหว่างการวิจัยนั้นการ incubate ไมโตคอนเดรียกับสารต่างๆใน reaction chamber จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา และควบคุมอุณหภูมิใน reaction chamber ให้คงที่โดยใช้น้ำจากเครื่อง water bath ซึ่งกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 37°C ไหลผ่านเข้าและออกส่วนของchamber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งห่อหุ้ม reaction chamber ไว้ตลอดเวลา (รูปที่ 20)

รูปที่ 20 แสดง Reaction chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor และ recorder)



เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาปริมาณออกซิเจนใน chamber จะมีค่าที่ระดับ 100% saturation แต่เมื่อไมโตคอนเดรียมีการหายใจ ปริมาณออกซิเจนใน chamber จะค่อยๆลดลง วัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนใน chamber ได้ด้วย Clark oxygen electrode (รูปที่ 21) ซึ่งมี Ag/AgCl electrodeเป็นขั้ว anode ล้อมรอบด้วย platinum electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้ว cathode เมื่อต้องการใช้งานจะใช้ half saturated KCl solution ฉาบผิวขั้ว electrode ทั้งสอง ทำหน้าที่เป็น salt bridge และมี standard Clark-type membrane (YSI Incorporated, USA) หุ้มปิดทับที่ขั้วของ electrode โดย membrane ชนิดนี้ยอมให้เฉพาะออกซิเจนผ่านเท่านั้น

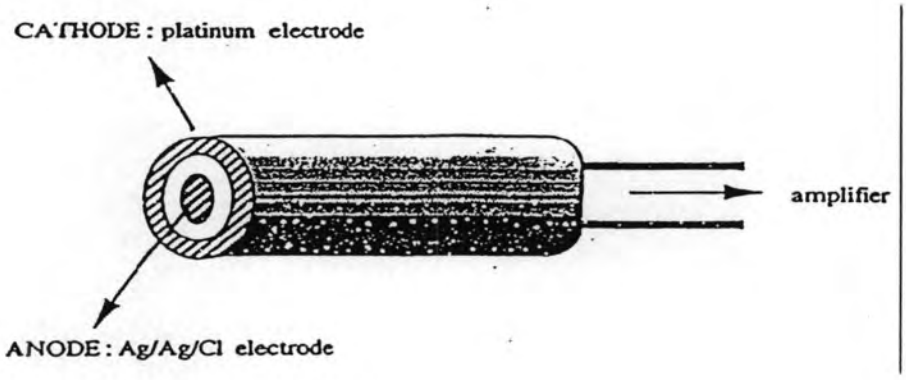
ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ

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

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

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

รูปที่ 21 แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว cathode



การแบ่งภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโตคอนเดรียมีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจน ซับสเตรต ADP + Pi หรือ การมี uncoupler หรือไม่ เป็นต้น Chance และ William (1956) ได้จัดแบ่งภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญในปฏิกิริยา ได้ดังนี้

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+}

การคำนวณดัชนีควบคุมการหายใจ(Respiratory Control Index, RCI) และ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

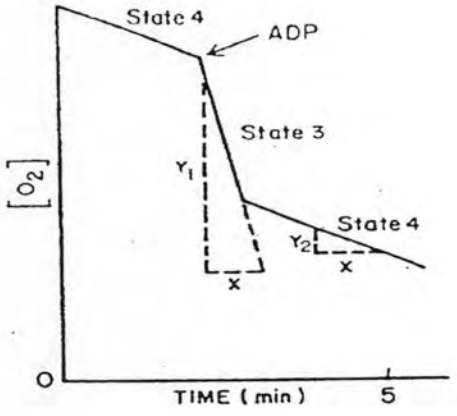
การคำนวณดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index, RCI)

นอกจาก Chance and William จะแบ่งภาวะ (states) การหายใจของไมโตคอนเดรียเป็นภาวะต่างๆดังกล่าวแล้ว ยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงการควบคู่กัน (coupling) ของกระบวนการoxidation และกระบวนการphosphorylation ซึ่งค่า RCI นี้แสดงถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมขึ้นได้ว่ามีคุณภาพดี คือ เป็น intact mitochondria หรือไม่ โดยปกติแล้วจะมีค่า RCI = 4 – 8

การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้ (รูปที่ 22)

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

รูปที่ 22 แสดงตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 22 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนด ให้เส้นที่ลากขนานแกน X ของทั้งสอง states ยาวเท่ากัน ดังนั้น

$$\text{Respiratory control index (RCI)} = \frac{Y1 / X}{Y2 / X} = \frac{Y1}{Y2}$$

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 23 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ได้ดังนี้

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

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

การคำนวณหาค่า S จะหาได้จากค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 ml หาได้จากสมการ

$$A = \frac{s \times p \times N \times 10^{9}}{V \times 100} \text{ n atoms O/ml}$$

เมื่อ A = จำนวน n atoms ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 ml

s = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนแปลงไปอยู่ที่ 0°C และ 760 mmHg) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37 °C

p = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21 %

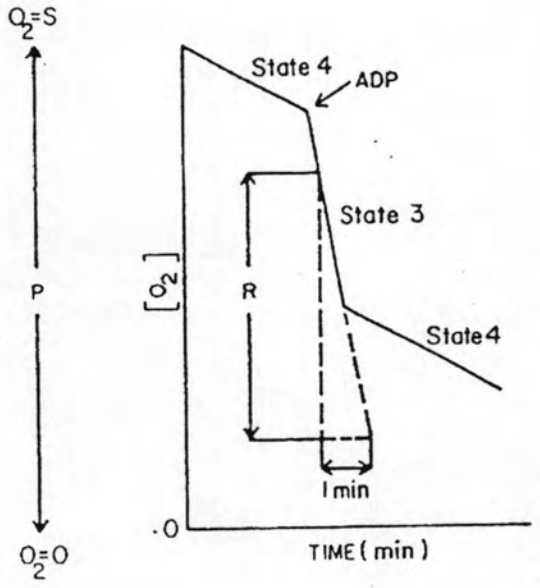
N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

V = ปริมาตรก๊าซที่ 0°C ความดัน 1 บรรยากาศเทียบกับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 ml

เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการดังกล่าว คำนวณหาค่าปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 ml (A) ที่อุณหภูมิ 37 °C มีค่าเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย แล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein

รูปที่ 23 แสดงตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในระยะต่างๆ



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

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

A = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ในน้ำ 1 ml

ค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ ที่ 37 °C ซึ่ง ค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆของoxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

2.5 การศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

2.4.1 การศึกษาผลของสารทดสอบ (quercetin และ naringenin) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต (NAD^+-linked substrates)

1) เติมซับสเตรตสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ดูผลการเปลี่ยนแปลง state 4 respiration เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 µl

3) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2 µl แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลง state 3 respiration

Incubation medium → mitochondria → glutamate+malate → สารทดสอบ → ADP + Pi

2.4.2 การศึกษาผลของสารทดสอบ (quercetin และ naringenin) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

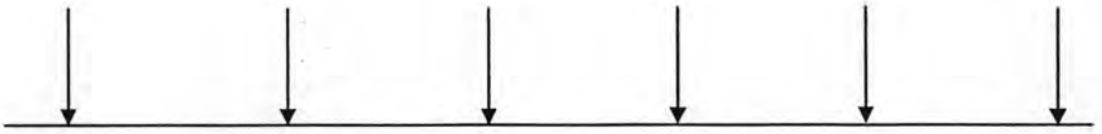
1) เติมซับสเตรตสำหรับ complex II คือ 1 M succinate ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติม 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2 µl เพื่อยับยั้ง complex I

3) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ดูผลการเปลี่ยนแปลง state 4 respiration เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 µl

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2 µl แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลง state 3 respiration

Incubation medium → mitochondria → succinate → rotenone → สารทดสอบ → ADP + Pi



2.4.3 การศึกษาผลของสารทดสอบ (quercetin และ naringenin) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

กรณีใส่สารทดสอบหลังใส่ DNP

1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2 µl เพื่อทำให้เกิด state 3u respiration

3) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ดูผลการเปลี่ยนแปลง state 3u respiration เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 µl

Incubation medium → mitochondria → glutamate+malate → DNP → สารทดสอบ

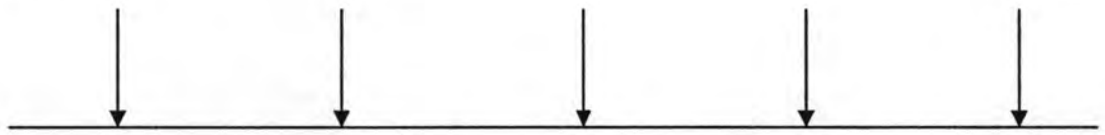
กรณีใส่สารทดสอบก่อนใส่ DNP

1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl

3) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2 µl เพื่อทำให้เกิด state 3u respiration ดูผลการเปลี่ยนแปลง เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 µl

Incubation medium → mitochondria → glutamate+malate → สารทดสอบ → DNP



2.4.4 การศึกษาผลของสารทดสอบ (quercetin และ naringenin) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

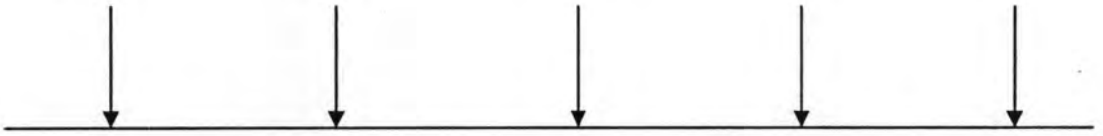
กรณีใส่สารทดสอบหลังใส่ DNP

1) เติม substrate คือ 1 M succinate ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2 µl เพื่อทำให้เกิด state 3u respiration

3) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ดูผลการเปลี่ยนแปลง state 3u respiration เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 µl

Incubation medium → mitochondria → succinate → DNP → สารทดสอบ



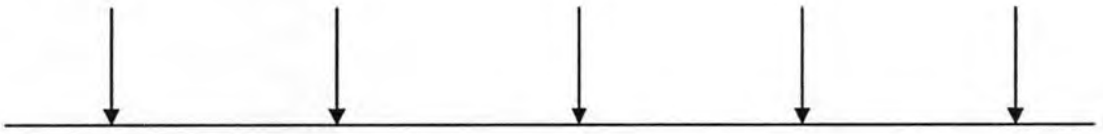
กรณีใส่สารทดสอบก่อนใส่ DNP

1) เติม substrate คือ 1 M succinate ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl

3) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2 µl เพื่อทำให้เกิด state 3u respiration ดูผลการเปลี่ยนแปลง เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 µl

Incubation medium → mitochondria → succinate → สารทดสอบ → DNP



2.6 การศึกษาผลของสาร ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

ทำการศึกษาเพื่อดูผลของ quercetin, naringenin ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งการศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรียนี้ สามารถทำได้โดยการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน mediumโดยใช้ pH-meter หรือโดยการวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP จากปฏิกิริยา hydrolysis ATP จะได้ ADP, Pi และ H^+ ดังสมการ

$$ATP + H_2O \xleftrightarrow{ATPsynthase(F_0F_1ATPase)} ADP + Pi + H^+$$

ดังนั้นในการศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. โดยการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (Bertina และ Slater, 1975)

2. โดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

สำหรับในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลาย ATP โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้ คือ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> เป็นการ incubate ไมโตคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลง centrifuge tube ที่มี 20 % w/v ของ trichloroacetic acid ปริมาณ 1 ml อยู่ก่อน แล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยา reduction ของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนด นำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเป็น blank แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จากกราฟมาตรฐานของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆ ครอบคลุมค่าตัวอย่าง

วิธีการวัดเพื่อหา ATPase activity ของไมโตคอนเดรียมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาณ 2.63 ml ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะควบคุมอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37°C

2. เติม mitochondrial suspension 200 µl

3. เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl แล้วรอเวลา 1 นาที (ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10 µl)

4. เติม 0.1 M ATP 150 µl แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที

5. เมื่อครบกำหนดเวลา 10 นาทีแล้ว ทำการหยุดปฏิกิริยาทันที โดยดูด reaction mixture มา ปริมาณ 1 ml แล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ที่มี 20% w/v trichloroacetic acid 1 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งทันที

6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน

7. ดูดส่วน supernatant ปริมาณ 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

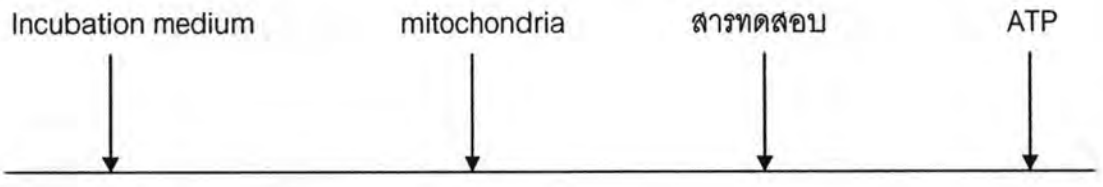
8. เติม 2.5% w/v ammonium molybdate 0.8 ml

9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 ml เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

10.นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample จะนำมาคำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้ คือ 3 x 2 = 6) จะได้เป็นค่าปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น

หมายเหตุ : - Fiske Subbarow reducing agent ประกอบด้วย 15% sodium bisulfite 97.5 ml, 20% sodium sulfite 2.5 ml และ1-amino-2 –naphthol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม

- ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2 – naphthol-4-sulfonic acid ละลายไม่หมด ให้กรองออก โดยใช้กระดาษกรอง และเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ไม่เกิน 1 เดือน



2.7 การวัดการเกิด lipid peroxidation ในไมโตคอนเดรีย

ทำการศึกษาเพื่อดูผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเกิด lipid peroxidation ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดย ascorbate กับ ferrous sulfate ของไมโตคอนเดรีย

ในการวิจัยนี้ตรวจวัดปริมาณของการเกิด lipid peroxidation โดยวิธี Thiobarbituric acid Assay (TBA) ตามวิธีของ Thiele และ Huff (1959) โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1. นำ rat liver mitochondrial pellets มา 100 µl incubate ใน 0.05 M inorganic phosphate buffer, pH 7.2 ปริมาณ 3 ml

2. เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl แล้วรอเวลา 1 นาที (ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10 µl)

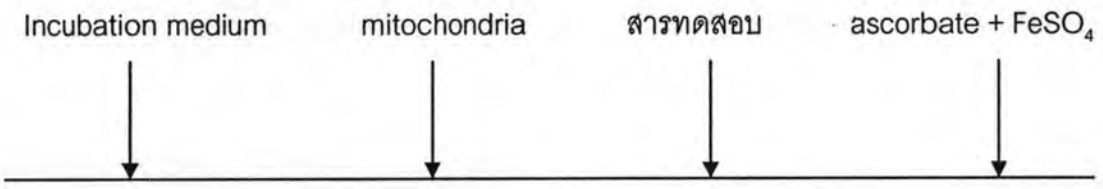
3. ใส่ 0.2 mg ascorbate และ 1 mM $FeSO_4$ จากนั้นนำมา incubate ใน shaker bath (Hetofrig, Danmark) oscillating 100 ครั้ง/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 38 °C

4. นำมาเติม 20% trichloroacetic acid 2 ml และนำมา centrifuge ที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูด supernatant มา 1 ml แล้วเติม 0.5% thiobarbituric acid 4 ml แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 15 นาที

6. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 535 nm ในความกว้าง cuvette ที่แสงผ่าน 10 mm

หมายเหตุ : 1 Unit คือ ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.100 ที่ความยาวคลื่น 535 nm ในความกว้าง cuvette ที่แสงผ่าน 10 mm



2.8 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase

monoamine oxidase (MAO) เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย มีหน้าที่ในการออกซิไดส์สารพวก amine โดยกระบวนการ oxidative deamination ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$R\text{-}CH_2NH_2 + O_2 + H_2O \longrightarrow R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$$

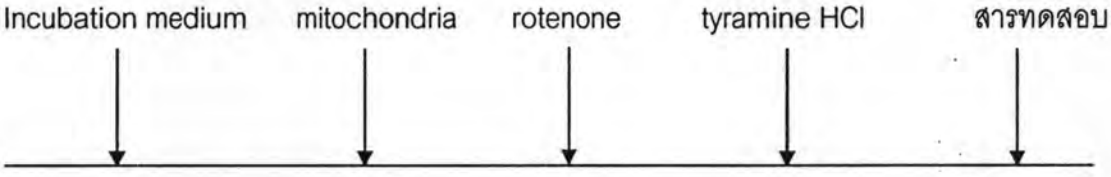
เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จำเป็นจะต้องใช้ออกซิเจน ดังนั้นจึงสามารถศึกษาการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้ โดยการติดตามปริมาณออกซิเจนที่ลดลงใน reaction chamber เมื่อใช้ substrate และ incubation medium ที่เหมาะสม โดยในการทดลองใช้ sodium phosphate buffer pH 7.2 เป็น incubation medium ส่วน substrate ที่ใช้ ได้แก่ 0.1 M tyramine เป็น substrate สำหรับ MAO-A และ MAO-B, 0.1 M 5-HT เป็น substrate สำหรับ MAO-A, 0.1 M benzylamine เป็น substrate สำหรับ MAO-B นอกจากนี้จะเติม respiratory chain inhibitor คือ rotenone ลงใน reaction chamber ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดส์ endogenous substrates ของไมโตคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปนั้นเกิดจากการที่ MAO นั้น ออกซิไดส์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว จากหลักการที่กล่าวมานี้ทำให้ทราบถึงการทำงานของ MAO ได้

รูปแบบการทดลองศึกษาผลของสารทดสอบ (quercetin และ naringenin) ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ของไมโตคอนเดรีย

2.8.1 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานของ MAO-A และ MAO-B

1) เติม substrate สำหรับ MAO-A และ MAO-B คือ 0.1 M tyramine ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2 µl อยู่

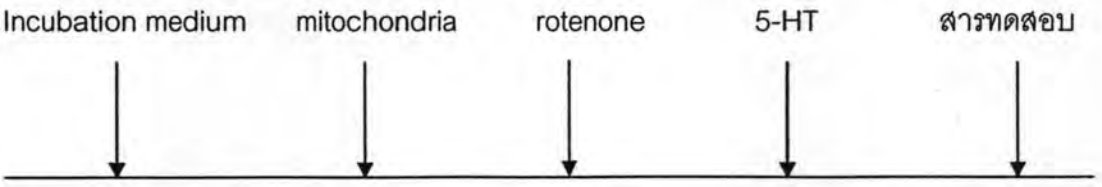
2) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจน เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10µl



2.8.2 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานของ MAO-A

1) เติม substrate สำหรับ MAO-A คือ 0.1 M 5-HT ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2 µl อยู่

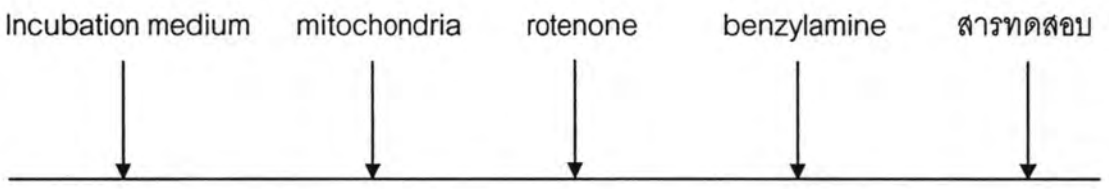
2) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจน เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 µl



2.8.3 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานของ MAO-B

1) เติม substrate สำหรับ MAO-B คือ 0.1 M benzylamine ปริมาณ 10 µl ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2 µl อยู่

2) เติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ10 µl ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจน เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 µl



การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of mean) และใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) ในการวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มทดลองแต่ละคู่โดยใช้ Scheffe และ ใช้ two-tailed paired Student's t-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มทดลองเมื่อใส่สารทดสอบก่อนและหลังการใส่ DNP ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$