5) ประเมินระดับ non-heme iron, reduced glutathione, collagen ในเนื้อเยื่อตับและกล้ามเนื้อหัวใจของหนูธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินและได้รับการรักษาด้วยสาร GTE
6) การศึกษาความเป็นพิษของสาร GTE และ EGCG ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง hepatocytes และ cardiomyocytes

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

สารสกัดหยาบและสารอิพิแกลโลคะเตชินแกเลตจากชาเขียว

การเตรียมสารสกัดหยาบจากชาเขียว

ทำการเตรียมสารสกัดหยาบ (green tea extract, GTE) และสารคะเตชินชนิดอิพิแกลโลคะเตชินแกเลต (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) จากชาเขียวตามวิธีการที่แสดงไว้ (Srichairatanakool, Ounjaijean et al. 2006) โดยนำยอดใบชา (*Camellia sinensis*) สดจำนวน 20 กิโลกรัมมาทำให้แห้งในตู้อบไมโครเวฟ (กำลังไฟ 800 วัตต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 3 นาที นำไปสกัดด้วยน้ำอุ่น 80 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที นำไปอบแห้งภายใต้สุญญากาศ (lyophilization) ได้เป็นผงสกัดหยาบชาเขียว (POWDERED GREEN TEA EXTRACT) โดยส่วนหนึ่งของ GTE ถูกนำไปวิเคราะห์หาเอกลักษณ์สารคะเตชินต่างๆที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี Analytical HPLC โดยใช้คอลัมน์วิเคราะห์ (Waters SpheroSorb-ODS2, 250x4.7 mm, 5-μm) ตัวทำละลายเคลื่อนที่สำหรับ isocratic elution (0.05% H_2SO_4 : acetonitrile : ethyl acetate = 86:12:2, *v/v/v*) ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และติดตามสารวิเคราะห์ต่างๆที่ถูกชะออกด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารคะเตชิน (C, EC, EGC, EGCG และ ECG) ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน

การเตรียมสารอิพิแกลโลคะเตชินแกเลตจากสารสกัดหยาบชาเขียว

อีกส่วนหนึ่งนำไปแยกเก็บ EGCG Fraction ด้วยวิธี Semi-preparative HPLC (Thephinlap, Ounjaijean et al. 2007) โดยใช้คอลัมน์หลัก (Luna ODS2, 250X10 mm, 5 μm, Phenomenex®, Torrance, California, USA) ต่อกับการ์ดคอลัมน์ (Luna ODS2, 50x10 mm, 5 μm, Phenomenex®, Torrance, California, USA) ตัวทำละลายเคลื่อนที่แบบ isocratic elution with solvent (methanol : H_2O = 29 : 71, *v/v*) ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามสารวิเคราะห์ต่างๆที่ถูกชะออกด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

นำสาร GTE ที่เตรียมได้มาตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเทียบกับสารมาตรฐาน trolox (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) (van den Berg, Haenen et al. 1999) และแสดงค่าที่วัดได้ออกมาเป็นหน่วย "มิลลิกรัมของสาร trolox/น้ำหนักชาแห้ง 1 กรัม"

น้ำยาเคมีที่ใช้

1) สารละลาย $ABTS^{\bullet+}$: ละลายสาร ABTS ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับผง MnO_2 เป็นเวลานาน 12-16 ชั่วโมงในที่มืดเพื่อออกซิไดซ์ ABTS ให้กลายเป็น $ABTS^{\bullet+}$ แล้วทำการเจือจางต่อด้วยสารละลาย PBS, pH 7.4 จนกระทั่งสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ นี้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.70±0.02
2) สารละลาย GTE ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมในสารละลาย PBS, pH 7.4
3) สารละลาย trolox ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมในสารละลาย PBS, pH 7.4

วิธีการทดลอง

ผสมสารละลาย GTE, EGCG, ECG และ trolox (10 ไมโครลิตร) กับสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ (1 มิลลิลิตร) แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้องนาน 1-6 นาที ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรเทียบกับสารละลาย sample blank (GTE และ trolox) ซึ่งผลการศึกษาพบว่าค่าต้านออกซิเดชันของ GTE และ EGCG มีค่าเท่ากับ 9.1 และ 4.7 มิลลิโมลาร์ TEAC/น้ำหนักชาแห้ง 1 กรัมตามลำดับ

การตรวจวิเคราะห์กรดไขมัน (Yamaguchi, Matsunaga et al. 1986; Yamaguchi, Matsunaga et al. 1986)

การศึกษานี้ใช้วิธี fluorescent-derivatized HPLC ที่มีความไวในการตรวจวัดสูงมาก (10^{-12} – 10^{-15} โมลาร์) สำหรับวิเคราะห์กรดไขมันอิสระ (free fatty acids, FFA) จากสารมาตรฐานและจากปฏิกิริยา alcoholic saponification (alcoholic KOH) ของสารองค์ประกอบในน้ำมันงา (Sesame oil) ตับของปลาสายรุ้ง พลาสมาและเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีของหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลกรดไขมันอิสระกับสารเรืองแสง 3-bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone (BMMQ) ในสภาวะที่มีไอออนโปตัสเซียม (รูป potassium carbonate) และสาร 18-crown-6 ether เปลี่ยนไปเป็นสารอนุพันธุ์เรืองแสง BMMQ-FFA ต่างๆที่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธี reversed-phase-HPLC โดยการชะแบบ gradient elution ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ นาน 45 นาที และติดตามตรวจวัดสารอนุพันธุ์เรืองแสงต่างๆ

การสกัดลิปิดจากสิ่งส่งตรวจ

นำเนื้อเยื่อหัวใจมาทำให้แห้งข้ามคืนโดยวิธี lyophilization ด้วยเครื่องมือ (Savant Speed-Vac Plus) เติมสารละลายน้ำเกลือลงไปแล้วทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication นาน 10-15 นาที ทำการสกัดลิปิดด้วยสารละลาย methanol ซึ่งมีสาร dichloromethane เป็น internal standard ดูดตัวทำละลายชั้นบนแยกออกมาแล้วระเหยให้แห้งด้วยไอก๊าซไนโตรเจน

นำเม็ดเลือดแดงมาทำการสกัดลิปิดด้วยสารละลาย isopropanol ซึ่งมีสาร dichloromethane เป็น internal standard (1:30:14.4, *v/v/v*) ดูดตัวทำละลายชั้นบนแยกออกมาแล้วระเหยให้แห้งด้วยไอก๊าซไนโตรเจน ส่วนพลาสมาให้นำมาสกัดลิปิดด้วยสารละลาย isopropanol และ NSS ซึ่งมีสาร dichloromethane เป็น internal standard (1:25:75:50, *v/v/v/v*) ดูดตัวทำละลายชั้นบนแยกออกมาแล้วระเหยให้แห้งด้วยไอก๊าซไนโตรเจน

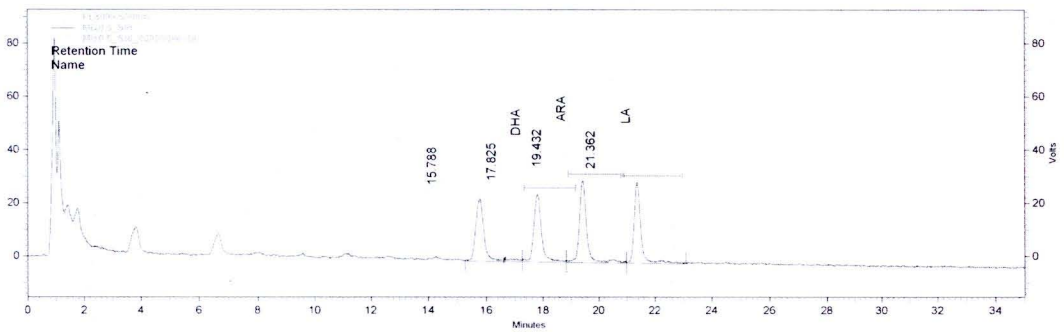
ลิปิดที่ถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ถูกนำมาเติมหมู่เมทธิลด้วยสารละลาย BF_3 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เมื่อเย็นลงให้นำมาสกัดด้วยสารละลายเฮ็กเซนและน้ำ (1:2:2, *v/v/v*) ดูดแยกชั้นเฮ็กเซนออกมาและนำไประเหยให้แห้งด้วยไอก๊าซไนโตรเจน สารอนุพันธ์ fatty acid methyl ester ที่ได้ถูกนำมาละลายใหม่ในเฮ็กเซน และนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ฉีดสารละลายตัวอย่าง (20 ไมโครลิตร) เข้าไปในเครื่องมือ HPLC ภายใต้สภาวะต่อไปนี้ analytical column (NovaPak® C18, 3.9mm x 150mm, 4 μm) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, continuous gradient elution (70 →100% acetonitrile) (0 → 30 min) อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามตรวจวัดการเรืองแสงของสารประกอบ FFA-BMMQ ด้วยเครื่องมือ on-line spectrofluorometer ($\lambda_{\text{excitation 362 nm}}/\lambda_{\text{emission 415 nm}}$) และอินตริเกตข้อมูลด้วยโปรแกรม ChemStation

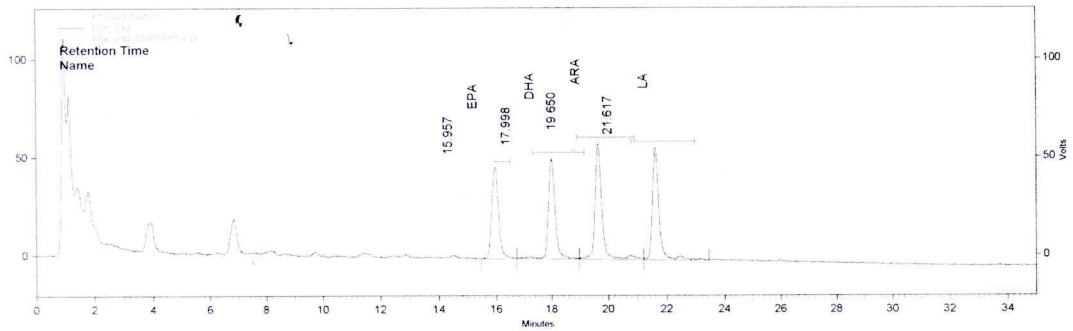
สารละลายกรดไขมันมาตรฐาน: ผสมสารละลาย eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), arachidonic acid (ARA) และ alpha-linolenic acid (ALA) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ และนำไปฉีดวิเคราะห์ (50 ไมโครลิตร) ด้วยวิธี HPLC

<u>*สารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์*</u>



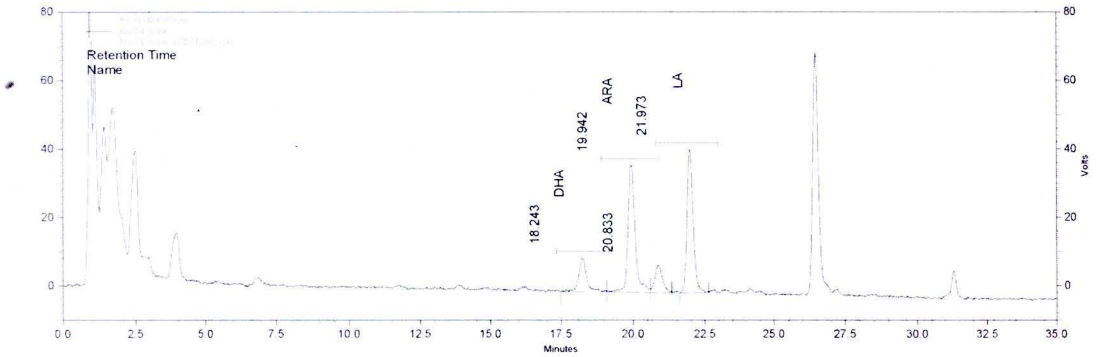
Standard fatty acids:	Retention Time	Peak area	%Peak area	Peak height	%Peak height
EPA	15.788 min	490738	23.84	23584	21.38
DHA	17.825 min	490123	23.81	25434	23.06
ARA	19.432 min	561777	27.29	30830	27.95
LA	21.362 min	515958	25.06	30454	27.61

สารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์



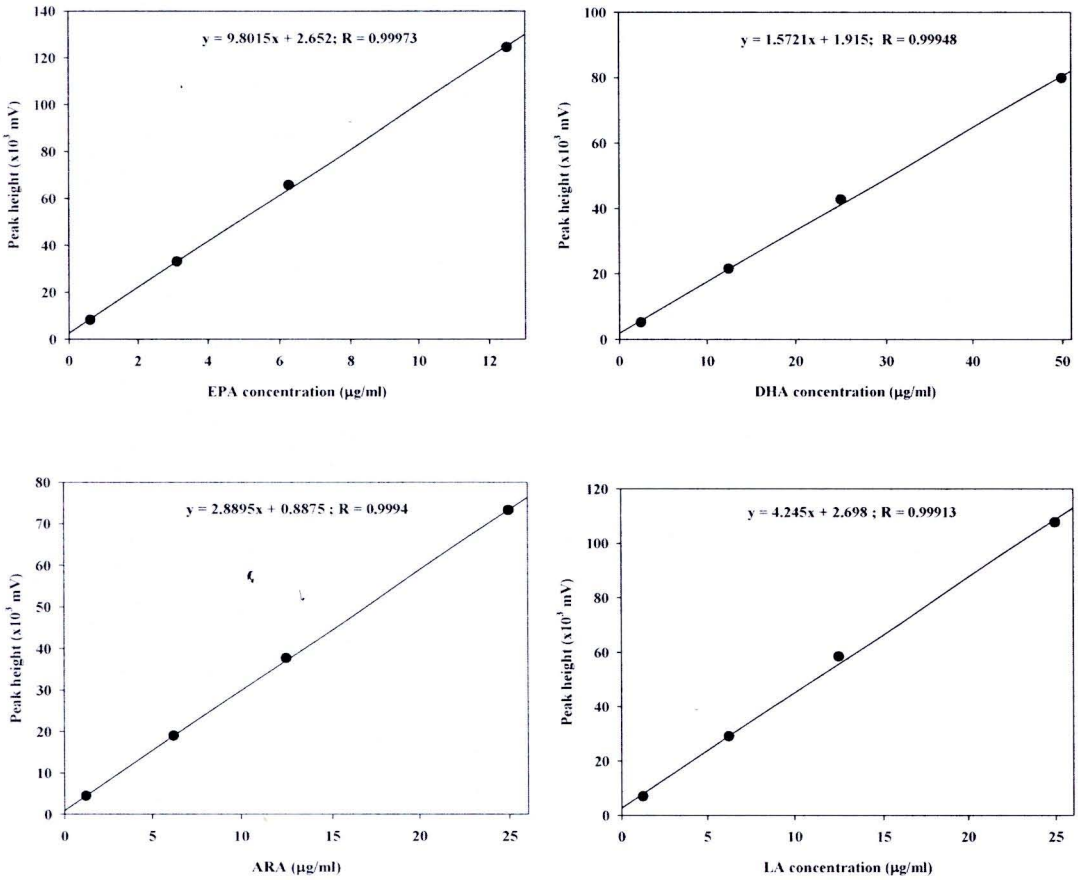
Standard fatty acids:	Retention Time	Peak area	%Peak area	Peak height	%Peak height
EPA	15.957 min	801470	22.31	46454	21.69
DHA	17.998 min	876135	24.39	51260	23.94
ARA	19.650 min	1003852	27.94	59105	27.60
LA	21.617 min	910949	25.36	57339	26.77

สารสกัดเนื้อเยื่อตับ



Detected fatty acids:	Retention Time	Peak area	%Peak area	Peak height	%Peak height
DHA	18.243 min	195460	12.12	9922	10.24
ARA	19.942 min	639063	39.63	37157	38.36
Unidentified peak	20.833 min	147117	9.12	7801	8.05
LA	21.973 min	630798	39.12	41978	43.34
OA	26.511 min	ND	ND	ND	ND

รูปที่ 5 Profile ของกรดไขมัน ARA, EPA, DHA และ LA ที่ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC/Fluorescent detection



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของกรดไขมัน ARA, EPA, DHA และ LA ที่วิเคราะห์จากวิธี HPLC

การตรวจฤทธิ์ปกป้องการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง (Albright and White 1982)

สาร GTE และ EGCG มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (anti-oxidation) และทำลายอนุมูลอิสระ (free-radicals scavenging) ได้ ดังนั้นจึงควรมีความสามารถต้านหรือป้องกันการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงจากสารออกซิแดนท์ (hydrogen peroxide-induced red cell hemolysis) ได้ด้วย

<u>น้ำยาเคมีที่ใช้</u>

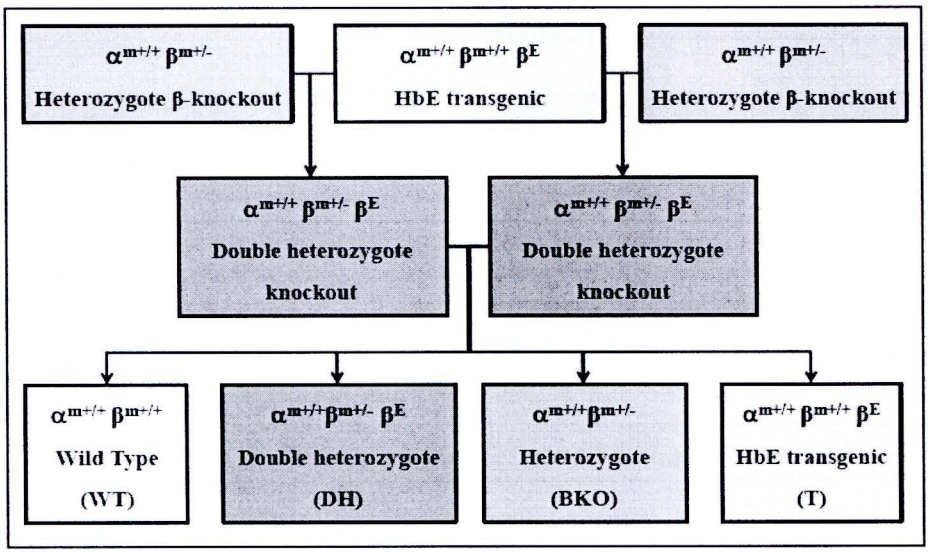
1) Red blood cell (RBC) suspension: แยกและเตรียม human normal และ thalassemic RBC ในสารละลาย PBS ให้มีค่า 5% hematocrit
2) สารละลาย Fe-NTA (0.1 mM เตรียมในสารละลาย 5 mM MOPS, pH 7.4)
3) สารละลาย H_2O_2 (0.1 mM เตรียมในสารละลาย 5 mM MOPS, pH 7.4)

<u>วิธีการทดลอง</u>

ผสม RBC suspension (1 มิลลิลิตร) กับสารละลาย GTE (12.5-100 mg/dl), EGCG (12.5-100 μM) และ DFP (12.5-100 μM) (50 ไมโครลิตร) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 mM Fe-NTA (100 ไมโครลิตร) และสารละลาย 0.1 mM H_2O_2 (100 ไมโครลิตร) ลงไป ตั้งไว้ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เติมสารละลาย PBS ลงไป 8 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกไป ดูดสารละลายใสชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณหาค่า %hemolysis โดยกำหนดให้เม็ดเลือดแดงที่แตกตัวด้วย hypotonic buffer (5 mM phosphate buffer, pH 7.0) มีค่า %hemolysis เท่ากับ 100

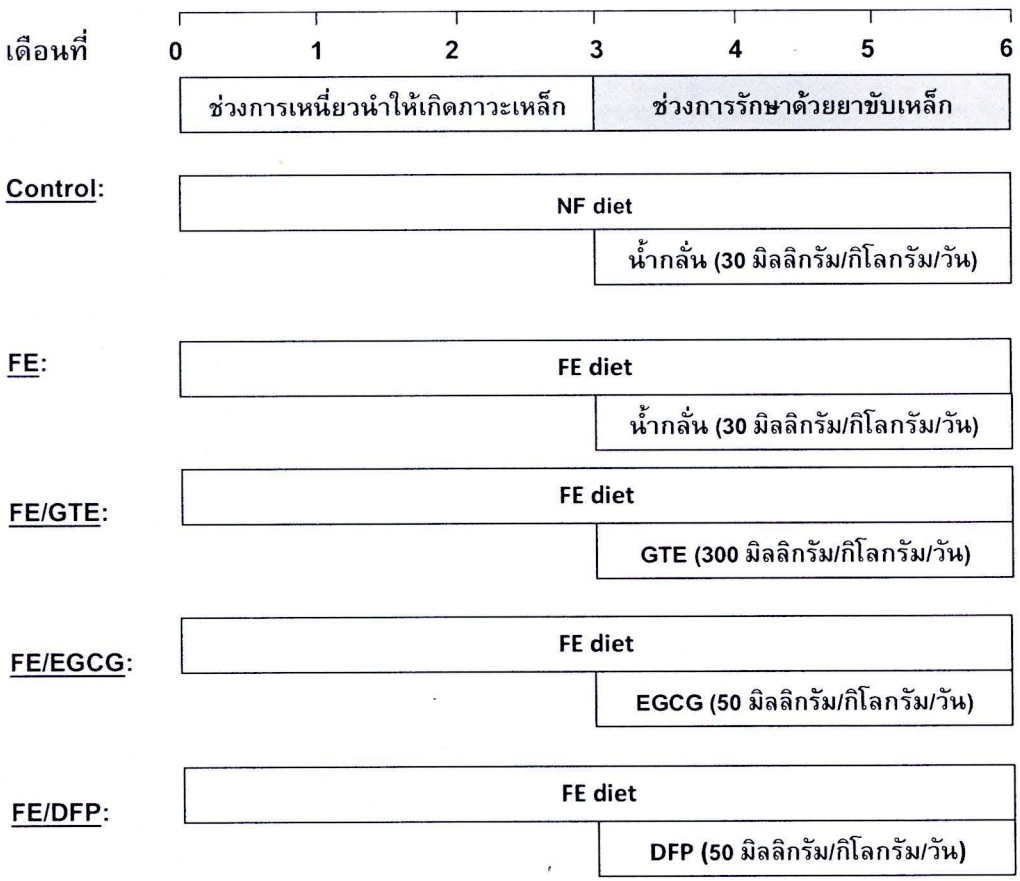
หนูทดลองที่ใช้ศึกษา (Thephinlap, Phisalaphong et al. 2009)

หนูทดลองที่ใช้ตลอดการศึกษาทดลอง ส่วนหนึ่งได้รับความอนุเคราะห์สนับสนุนจากโครงการวิจัยธาลัสซีเมียของศาสตราจารย์ นพ . สุทัศน์ ฟู่เจริญ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา อีกส่วนหนึ่งได้รับพ่อพันธุ์ -แม่พันธุ์จากโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย แล้วนำมาแพร่พันธุ์ต่อ ซึ่งประกอบด้วยหนูกลุ่มปกติ (wild-type, WT) และหนู ธาลัสซีเมียชนิด β-thalassemic (BKO, Hbb^{th-3}/Hbb^{+}) หรือ β-knockout mice และหนู ธาลัสซีเมียชนิด double heterozygous knockout (DH, $\alpha^{m+/+}$ $\beta^{m+/-}$ β^{E}) (รูปที่ 7) วิธีการศึกษาต่างๆในหนูทดลองได้ยื่นเสนอและได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Reference Number 3/2548)



รูปที่ 7 แผนผังการผสมพันธุ์และแพร่พันธุ์หนูธาลัสซีเมีย

ทำการเลี้ยงหนูทดลองในกรงสเตนเลส (3-4 ตัวต่อกรง) ที่รองพื้นด้วยขี้เลื่อย สภาวะห้องหนูทดลองถูกควบคุมให้มีอุณหภูมิคงที่ 23±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60±5% ปรับช่วงเวลา (กลางวัน 12 ชั่วโมง/กลางคืน 12 ชั่วโมง) อัตโนมัติ เลี้ยงดูด้วยอาหารปกติสูตรมาตรฐาน (normal formula diet หรือ NF diet) ซึ่งประกอบด้วยความชื้น 12% โปรตีน 24% ไขมัน 4.5% กากใย 5% พลังงาน 3040 กิโลแคลอรีต่อกรัม แคลเซียม 1% ฟอสฟอรัส 0.9% โซเดียม 0.2% โปตัสเซียม 1.17% แมกนีเซียม 0.23% แมงกานีส 171 พีพีเอ็ม ทองแดง 22 พีพีเอ็ม สังกะสี 100 พีพีเอ็ม เหล็ก 180 พีพีเอ็ม โคบอลต์ 1.82 พีพีเอ็ม ซีลีเนียม 0.1% วิตามินเอ 20000 หน่วยสากลต่อกิโลกรัม วิตามินดี 4000 หน่วยสากลต่อกิโลกรัม วิตามินอี 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินเค 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินบีหนึ่ง 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินบีสอง 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินบีหก 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินบีสิบสอง 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม niacin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กรดโฟลิก 6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไบโอติน 0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโคลีนคลอไรด์ 1500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับอาหารเสริมธาตุเหล็ก (0.2% w/w ferocene supplemented diet หรือ FE) เตรียมขึ้นเองโดยการเติมสาร iron ferrene หรือ ferocene (0.2 กรัม% โดยน้ำหนัก) ลงไปในอาหารสูตรมาตรฐาน หนูทดลองดูดน้ำกลั่นบริสุทธิ์เองที่บรรจุในขวดพลาสติก (โพลีเอทธิลีน) เอง



หมายเหตุ ส่วนหนูธาลัสซีเมีย β^E-transgenic (TG, Tg ($LCR\varepsilon^G\gamma^A\gamma\delta\beta^E$) Hbb^+/Hbb^+) ไม่ได้ทำการศึกษาเนื่องจากมีอุปสรรคด้านพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ที่ได้รับมามีสภาพร่างกายไม่ค่อยแข็งแรง ผลการผสมพันธุ์ส่วนใหญ่ให้รุ่นลูกที่เป็นหนู WT (60-75%) และหนู BKO (25-40%) มีบางครั้งได้รุ่นลูกที่เป็นหนู DH (1-2%) แต่ก็มีสภาพร่างกายไม่สมบูรณ์และเสียชีวิตลงเมื่อมีอายุ 1-2 สัปดาห์หรือถูกแม่กัดกินจากภาวะเครียดทางร่างกาย ส่วนหนู TG แทบจะไม่สามารถทำการแพร่พันธุ์ลูกหลานได้เลย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาในหนูพันธุ์ปกติ (normal phenotype & genotype) เปรียบเทียบกับหนูธาลัสซีเมีย BKO (thalassemia intermedia phenotype) ที่มีภาวะ mild anemia และมีร่างกายแข็งแรงเพียงพอที่จะรับสภาวะเหล็กเกินได้นาน 6-8 เดือน

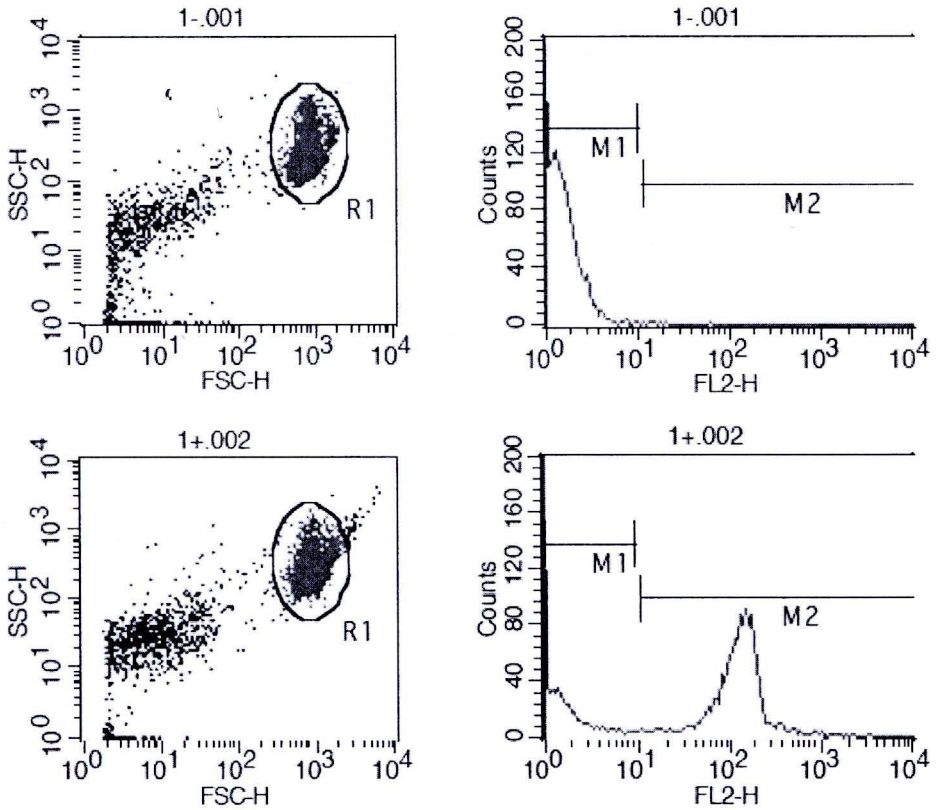
การเหนี่ยวนำหนูทดลองให้มีภาวะเหล็กเกิน (Iron loading) โดยการ เลี้ยงด้วยอาหารธาตุเหล็ก (ferrene supplemented diet, FE diet) เป็นเวลา 5 วันต่อสัปดาห์ (จันทร์-ศุกร์) นาน 3 เดือน ช่วงเวลาระหว่างนั้นเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณปลายหางมาทำตรวจวัดระดับ NTBI (Singh, Hider et al. 1990) ทุกสัปดาห์จนพบว่ามีระดับเกิน 1 ไมโครโมลาร์ ต่อจากนั้นจึงทำการแบ่งหนูทดลอง WT และ BKO ที่มีภาวะเหล็กเกินออกเป็นกลุ่มต่างๆและ ทำการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยาขับเหล็กมาตรฐาน DFP ด้วยวิธีการกิน (ดังแสดงข้างล่าง) เป็นเวลานาน 3 เดือน

ทำการเจาะเลือด (whole blood) จากเส้นเลือดดำบริเวณหางหนู (0.1 มิลลิลิตรต่อครั้ง) ทุกเดือน ใส่ในหลอดทดลองที่มีสาร lithium heparin เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว เพื่อนำไปตรวจวัดค่าตัวชี้วัดต่างๆทางชีวเคมี (ได้แก่ NTBI, TBARS) และทางโลหิตวิทยา (ได้แก่ hemoglobin, erythrocyte oxidative stress) เมื่อครบเวลา 3 เดือนในการบำบัดรักษาด้วยยาขับเหล็ก ให้ทำการุณฆาตหนูทดลองโดยทำการสลบด้วยไออีเธอร์ ทำการเปิดช่องท้อง เจาะดูดเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) เพื่อนำไปตรวจวัดระดับค่าตัวชี้วัดต่างๆ ทำการตัดแยกอวัยวะสำคัญ (ได้แก่ตับ ม้ามและหัวใจ) ออกมาชั่งน้ำหนัก (wet weight) และแบ่งแยกเนื้อเยื่อต่างๆเหล่านั้นเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา (ได้แก่ Hematoxylin and Eosin (H&E) staining, Perl's staining และ Mason trichrome staining) และทางชีวเคมี (ได้แก่ Ferrozine colorimetric assay, Ehrich's reagent-based hydroxyproline assay)

การศึกษาผลของสาร GTE และ EGCG ต่อการมีชีวิตของเม็ดเลือดแดงในหนูทดลอง

สาร catechins (เช่น EGCG และ ECG) ในชาเขียวมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและจับตรึงธาตุเหล็กได้ ดังนั้นจึงควรมีศักยภาพช่วยยืดอายุของเม็ดเลือดแดง (RBC survival) ในหนู WT และ BKO ให้ยืนยาวขึ้น (โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะที่หนูทดลองมีภาวะเหล็กเกิน) เราทำการตรวจวัดอายุเม็ดเลือดแดงด้วยการใช้สารไบโอตินติดฉลากสารไกลโคฟอริน (glycophorin) บนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วย้อมอีกครั้งด้วยสารละลาย phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin และนำไปตรวจวัดการเรืองแสงสีแดงของเม็ดเลือดแดง (PE-conjugated streptavidin-biotin-glycophorin=RBC) ด้วยวิธีโฟลไซโตเมตรี

ทำการฉีดสารละลายไบโอติน (EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin, Pierce, Rockford, IL, USA) (ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเข้าเส้นเลือดดำบริเวณหางหนู จากนั้นทำการเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณหางหนูประมาณ 2-3 ไมโครลิตรในช่วงเวลาต่างๆ ทำการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกมาและล้างด้วยสารละลาย HEPES-buffer saline (HBS) ที่ประกอบด้วย 10 mM HEPES, pH 7.4 และ 165 mM NaCl เตรียมและนำ RBC suspension ($5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มาทำการย้อมด้วยสารละลาย PE-conjugated streptavidin (5 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรในสารละลาย 2.5 mM $CaCl_2$-supplemented HBS) และนำไปตรวจวัดค่าการเรืองแสง (fluorescent unit, FI) ด้วยเครื่องมือ FACS-Caliber flow cytometer (Becton-Dickinson) (de Jong, Emerson et al. 2001; Manodori and Kuypers 2002) ซึ่งจะให้ผลการทดลองดังรูปที่ 8 ที่แสดงสัญญาณการเรืองของกลุ่มประชากรเม็ดเลือดแดง



รูปที่ 8 Scatter plot และ Histogram plot ของการเรืองแสง (M2) ของเม็ดเลือดแดง (R1) ที่ไม่ได้ย้อม (แถวบน) และย้อม (แถวล่าง) ด้วยสารเรืองแสง PE

การเตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ

น้ำยาและอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

สารละลาย 10x Leffert's buffer (250 mM HEPES, 1.15 M NaCl, 50 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 pH 7.4) ละลาย HEPES 59.57 กรัม NaCl 62.27 กรัม KCl 3.73 กรัม KH_2PO_4 1.36 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย 10 N NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน นำมากรองผ่าน filter membrane (0.2 μm)

สารละลาย 1 M $CaCl_2$ ละลาย $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ จำนวน 73.5 กรัมในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ

สารละลาย 0.2 M EGTA (ethyleneglycol tetraacetic acid) ละลาย EGTA จำนวน 38.04 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรนำมากรองผ่าน filter membrane (0.2 μm)

สารละลาย Chelation buffer A (1x Leffert's/0.5 mM EGTA) เติม 0.625 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.2 M EGTA ลงไป พร้อมปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วย 1x Leffert's buffer บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

สารละลาย Collagenase buffer (1x Leffert's/1 mM $CaCl_2$) เติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย 1 M $CaCl_2$ ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วย 1xLeffert's buffer 1 ชั่วโมงก่อน perfusion ทำการละลาย Collagenase type IV 70 มิลลิกรัม ลงในสารละลาย buffer (1x Leffert's/1 mM $CaCl_2$) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

สารละลาย Buffer C (1x Leffert's/2 mM $CaCl_2$) เติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย 1 M $CaCl_2$ ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วย 1x Leffert's buffer ก่อนทำการ perfusion ทำการละลาย BSA 1.5 กรัม ลงในสารละลาย buffer (1xLeffert's/2 mM $CaCl_2$) บ่มในอ่างน้ำแข็ง ในการทดลองอาจจำเป็นต้องเพิ่ม growth factor ที่จำเป็นต่อการเจริญและการมีชีวิตรอดของเซลล์ ตัวอย่างเช่น epidermal growth factor (EGF), insulin, hydrocortisone, transferrin เพื่อให้มีปริมาณเซลล์เพียงพอและอยู่รอดได้นานตลอดช่วงการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับชนิดปฐมภูมิ (Schmidt, Schmitz et al. 2005)

นำตับจากหนูเมาส์ (C57/BL6) ที่ทำการุณฆาตแล้วมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ล้างที่ประกอบด้วย 5.4 mM KCl, 116 mM NaCl, 20 mM HEPES, 25 mM $NaHCO_3$, 5.6 mM glucose pH 7.4 และ 0.63 mM EGTA ย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (0.025%, *w/v* และมีปริมาณ $CaCl_2$ 0.75 g/l) นำ hepatocyte pellet ที่ได้มาเติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ Krebs Ringer ที่ประกอบด้วย 3% BSA, 25 mM $NaHCO_3$, 20 mM HEPES pH 7.4, penicillin 100U/ml และ streptomycin 100 mg/ml จากนั้นนำ hepatocyte suspension ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM) ที่ประกอบด้วย penicillin 100U/ml, streptomycin 100 mg/ml, Fungizone 3.75 mg/ml, dexamethazone 1 mM , insulin 0.2 U/ml, fetal bovine serum 10% (*v/v*) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ HepG2 (Huang, Chen et al. 2001)

นำ HepG2 cells ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM) ที่ประกอบด้วย penicillin 100U/ml, streptomycin 100 mg/ml, Fungizone 3.75 mg/ml, dexamethazone 1 mM, insulin 0.2 U/ml, fetal craft serum 10% (*v/v*) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำเซลล์ตับเพาะเลี้ยงที่ได้มาตรวจวัดการรอดชีวิตด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion โดยการแบ่งเซลล์ตับลงในจานพลาสติกเลี้ยงปราศจากเชื้อโรค ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ เมื่อครบเวลา ดูดเอาสารละลาย Buffer C ออกทิ้ง เติมสีย้อม trypan blue ลงไปใน hepatocyte suspension ค่อยๆเขย่าให้ผสมกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที นำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์แก้ว ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ตาย (ติดสีน้ำเงิน) และจำนวนเซลล์มีชีวิต (ไม่ติดสีน้ำเงิน) แล้วคำนวณหา %cell viability

การเตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (O'Connell, Rodrigo et al. 2007)

น้ำยาและอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

สารละลาย Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Free Ca^{2+}/Mg^{2+}, pH 7.4 เตรียมโดยละลาย NaCl 8.00 กรัม KCl 0.40 กรัม Glucose 2.70 กรัม $NaHCO_3$ 0.35 กรัม KH_2PO_4 5.99 กรัม และ Na_2HPO_4 4.83 กรัมในน้ำปราศจากไอออนประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย 10 N. NaOH และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน นำมากรองผ่าน filter membrane (0.22 µm)

สารละลาย collagenase ละลายผงเอนไซม์ collagenase type II 4 มิลลิกรัมในสารละลาย HBSS 2 มิลลิลิตร กวนสารละลายบนอ่างน้ำแข็งนาน 30-60 นาที กรองผ่าน filter membrane (0.22 µm) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย trypsin (0.25 %) ละลายผงเอนไซม์ trypsin 2.5 มิลลิกรัมในสารละลาย 1 mM EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารละลาย fungizone ละลายยา clotrimazole 10 มิลลิกรัมใน HBSS 4 มิลลิลิตร

สารละลาย Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep) ละลาย Penicillin/Streptomycin 10 ,000 U/10,000 mg/ml ใน HBSS

สารละลาย serum-free M199 Medium ละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ M199, HEPES 4.76 กรัม (20 mM), $NaHCO_3$ 2.20 กรัม (26.2 mM) ในน้ำกลั่นปราศจากไอออนประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยสารละลาย 10 N. NaOH ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน นำมากรองผ่าน filter membrane (0.22 µm)

สารละลาย complete M199 Medium นำ Serum-free M199 medium มาเติม Fetal Bovine Serum (20%) และ Pen-Strep solution (1%)

การแยกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

ทำการดมสลบหนูเมาส์ (adult C57BL6 น้ำหนัก 30 กรัม) ด้วย diethyl ether จากนั้นทำการผ่าเปิดช่องท้อง จากนั้นจึงตัดหัวใจหนูออกมาวางลงใน Petri dish ที่มี Serum-free M199 นำหัวใจหนูไปแช่และจุ่มลงใน HBSS 5 นาที และแช่ใน clotrimazole 5 นาที แล้วนำหัวใจหนูไปล้างใน HBSS 1-2 นาที นำไปแช่และจุ่มใน Pen-Strep 5-10 นาที และล้างใน HBSS อีก 1-2 นาที จากนั้นจึงนำหัวใจหนูไปวางใน Petri dish ที่มี Serum-free M199 อีก plate หนึ่ง แล้วตัดชิ้นเนื้อเอาเฉพาะส่วนของ ventricle และตัดให้มีขนาดเล็กมากๆ โดยใช้ forceps และมีดผ่าตัด

นำ Media และชิ้นเนื้อที่ได้ใส่ใน 15-ml centrifuge tube ทำการปั่นแยกเซลล์กับ suspension โดย centrifuge ที่ 3000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ทิ้ง นำชิ้นเนื้อส่วนที่เหลือมาแยกโดยเติมสารละลาย collagenase 2 มิลลิลิตร ดูดขึ้น -ลง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 5%CO_2 incubator นาน 15 นาที เติม Complete M199 medium ลงไป 4 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นแยกที่ 3000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ทิ้ง

เติมสารละลาย trypsin ลงไป 2 มิลลิลิตร ดูดขึ้น-ลง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 5%CO_2 incubator นาน 15 นาที เติม complete M199 ลงไป 4 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นแยกที่ 3000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ทิ้ง

การเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

เติม Complete M199 medium ลงไป 5 มิลลิลิตรใส่ใน centrifuge tube ขนาดความจุ 15 มิลลิลิตร เพื่อ resuspend cell pellet แล้วเขย่าผสม จากนั้นจึงปิเปต cell suspension ที่มี Complete M199 medium อยู่ 5 มิลลิลิตร ลงใน culture T flask และนำไปเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสใน CO_2 incubator เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์หัวใจปฐมภูมิได้ประมาณ 10 วัน ก็จะทำการ trypsinized เซลล์ แล้วส่วนตะกอนของเซลล์ไปทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion test จากนั้นจึงแบ่งเซลล์และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะผิวภาชนะ

เมื่อครบเวลา ดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารสกัดที่ต้องการทดสอบคือ GTE, FAC, EGCG และ DFP ที่ความเข้มข้นต่างๆลงในจานเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้อบ 5%CO_2 incubator เมื่อครบเวลา ดูดเอาสารละลายทิ้ง ตรวจวัดความเป็นพิษ (Cytotoxicity test) ของสารทดสอบต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วยเทคนิค MTT method โดยการเติมสารละลาย MTT dye ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูดสารละลายทั้งหมดทิ้ง และเติมสารละลาย dimethyl sulphoxide (DMSO) ลงไป และทำการบ่มต่ออีก 10 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540/630 นาโนเมตร

การศึกษาผลของ GTE และ EGCG ต่อระดับ LIP ในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์เพาะเลี้ยง primary hepatocytes, HepG2 cells และ cardiomyocytes มาเติมสารละลาย ferric ammonium citrate (FAC, 1 mM) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์มีภาวะเหล็กเกิน (Wu and

Cederbaum 2008) แล้วทำการรักษาด้วย GTE, EGCG, DFP และ DFO ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 วัน จากนั้นจึงนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปตรวจวัดระดับ LIP ที่มีอยู่ด้วยวิธี calcein fluorescent method

การศึกษาผลของ GTE และ EGCG ต่อภาวะ oxidative stress ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

นำเซลล์ตับเพาะเลี้ยงมาเติมสารละลาย FAC (ความเข้มข้น 0.1 mM) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์มีภาวะเหล็กเกินและออกซเดทีฟสเตรส แล้วทำการรักษาด้วย GTE, EGCG, DFP และ DFO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 วัน จากนั้นจึงนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปตรวจวัดระดับ ROI ด้วยวิธี DCF fluorescent method

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของ GTE และ EGCG ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

นำเซลล์ตับเพาะเลี้ยงมาเติมด้วยสารละลาย FAC, GTE, EGCG, DFP และ DFO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 วัน แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (viable cells) ด้วยวิธี MTT method (ดังรายละเอียดข้างล่าง)

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของ GTE และ EGCG ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยง

นำเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยงมาเติมด้วยสารละลาย FAC, GTE, EGCG, DFP และ DFO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 วัน แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (viable cells) ด้วยวิธี MTT method (ดังรายละเอียดข้างล่าง)

การตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด (Gambino and Sunderman 1965)

เติมเลือด heparinized blood (20 ไมโครลิตร) ลงในน้ำยา Drabkin's solution (5 มิลลิลิตร) เขย่าให้ผสมกันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเทียบกับ Drabkin's solution แล้วเทียบหาปริมาณความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจากการฟมาตรฐาน

การตรวจวัดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมา (Singh, Hider et al. 1990)

เติมสารละลาย NTA ความเข้มข้น 800 มิลลิโมลาร์ (50 ไมโครโมลาร์) ลงในพลาสมาตัวอย่าง (450 ไมโครลิตร) เพื่อดึงธาตุเหล็กรูป NTBI ให้กลายเป็น Fe-$(NTA)_2$ นำไปปั่นผ่าน ultrafiltration membrane (30-kD molecular weight cut-off) เพื่อกำจัดโปรตีนต่างๆในพลาสมาออกไป นำสารละลายที่ปั่นได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กรูป NTBI ด้วยวิธี RP-HPLC โดยอาศัยหลักการคือ สาร 1-methyl-

2-propyl--3-hydroxypyridin-4-one (หรือCP22) ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายชะที่ประกอบด้วย 19% acetonitrile ใน 5 mM MOPS, pH 7.0 จะเข้าแย่งจับธาตุเหล็กจากสารประกอบ Fe^{3+}-$(NTA)_2$ ทันที แล้วเปลี่ยนเป็นสารประกอบ Fe^{3+}-$(CP22)_3$ ซึ่งมีสีแดงและสามารถตรวจวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่า peak area ของ NTBI peak ที่แยกได้ไปหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน standard Fe curve ที่สร้างขึ้นจากสารละลาย Fe-NTA ความเข้มข้น 0-32 ไมโครโมลาร์

การตรวจวัดระดับธาตุเหล็กรูป LIP ในเซลล์ (Cabantchik, Glickstein et al. 1996)

วิธี calcein-fluorescent technique ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจวัดปริมาณเหล็กอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ตับ สาร calcein acetomethoxy (calcein AM) ที่เติมลงไป จะแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์และถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ esterase ในเซลล์ได้เป็นสาร calcein ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสงถ้าถูกกระตุ้นด้วยลำแสงเลเซอร์ สารประกอบธาตุเหล็กภายในเซลล์เรียกว่า labile iron pool (LIP) หรือ labile cell iron (LCI) เกิดปฏิภาคโดยตรงกับอณูสาร calcein ทำให้เกิดการเรืองแสงของสาร calcein ลดลง สาร iron chelator เช่นยาขับเหล็กดีเฟอริโพรน (DFP) และสารสกัดหยาบที่ประกอบด้วยคะเตชิน (green tea catechins) สามารถแย่งจับกับ LCI ได้ ทำให้การเรืองแสงกลับเพิ่มมากขึ้น

Hepatocyte culture

นำเซลล์ตับที่ได้มาย่อยด้วยเอมไซม์ trypsin เพื่อแยกเซลล์ตับที่เกาะบนผิวภาชนะให้หลุดออกมา ปั่นล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง เติมสารละลาย FAC (1 mM) ลงไปเซลล์ตับเพาะเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณเหล็กในเซลล์ก่อนและหลังการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP โดยทำการย้อมเซลล์ตับด้วยสารละลาย calcein AM นำไปวัดการเรืองแสง (calcein) ของเซลล์ด้วยเครื่องมือ 96-well plate reader spectrofluormeter แล้วคำนวณค่าที่วัดเป็น Fluorescence intensity (FI) unit/10^6 cells

Cardiomyocyte culture

นำเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เตรียมได้มาเติมสารละลาย FAC (1 mM) ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณเหล็กในเซลล์ก่อนและหลังการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP โดยทำการย้อมเซลล์ตับด้วยสารละลาย calcein AM นำไปวัดการเรืองแสง (calcein) ของเซลล์ด้วยเครื่องมือ 96-well plate reader spectrofluormeter แล้วคำนวณค่าที่วัดเป็น FI unit/10^6 cells

การตรวจวัดระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Shen, Shi et al. 1996; Amer, Goldfarb et al. 2004)

เอนไซม์ esterase ในเซลล์มีชีวิตจะไฮโดรไลซ์สารเคมี 2'-7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA) ที่แพร่ซึมเข้าไปในเซลล์ให้กลายเป็นสาร 2'-7'-dichlorofluorescin (DCFH) ก่อน จากนั้น

สารประกอบ ROI ที่มีอยู่ภายในเซลล์จะออกซิไดซ์สาร DCFH ให้กลายเป็นสาร oxidized dichlorofluorescein (DCF) ที่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ ซึ่งความเข้มของการเรืองแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ ซึ่งแสดงค่าที่วัดได้เป็น FI unit

Hepatocyte cultures

นำเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (cell suspension) มาเติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสาร 10 μM DCFH-DA ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 5%CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ล้างเซลล์ เติมสารละลาย FAC (100 μM) ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเติมสาร GTE และสาร EGCG ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 5%CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดการเรืองแสงของเซลล์ด้วยเครื่องมือ 96-well plate reader spectrofluorometer ($\lambda_{excitation\ 488\ nm}$/ $\lambda_{emission\ 512\ nm}$) แล้วคำนวณค่าที่วัดออกมาเป็น FI unit

Erythrocytes

เตรียม RBC suspension ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ให้มีปริมาณ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย DCF-DA ลงไป ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO_2 atmospheric condition) นาน 15 นาที นำไปตรวจวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องมือ flow cytometer (Becton Dickinson FACScan (BD Bioscience, CA) และวิเคราะห์ข้อมูลที่วัดได้ด้วยโปรแกรม Cell Quest software (Becton Dickinson)

การตรวจวัดค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย (Ran, Xu et al. 2007)

สารเคมี dihydrorhodamine123 (DHR123) เป็น oxidant sensitive-fluorescent probe ที่ใช้ตรวจวัดสาร ROS ที่อยู่ในไมโตคอนเดรียได้ดีกว่าสาร DCF สาร ROS จะออกซิไดซ์สาร DHR123 ให้กลายเป็นสาร R123 ที่เรืองแสงสีแดง โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาเติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสาร 10 μM DHR123 ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 5%CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ล้างเซลล์และเติมสารละลาย ammonium ferric citrate (100 μM) ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเติมสาร GTE และสาร EGCG ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 5%CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดการเรืองแสงของเซลล์ด้วยเครื่องมือ 96-well plate reader spectrofluorometer ($\lambda_{excitation\ 505\ nm}$/ $\lambda_{emission\ 529\ nm}$) แล้วคำนวณค่าที่วัดออกมาเป็น FI unit

การตรวจวัดความเป็นพิษเฉียบพลันต่อเซลล์ (Jover, Ponsoda et al. 1992)

สารสกัดจากชาเขียวที่ดีต้องไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิตและไม่มีผลทำให้เซลล์เหล่านั้นตาย

ได้ (cell viability) ในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร GTE และ EGCG จากชาเขียวต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay โดยอาศัยหลักการที่เซลล์มีชีวิตยังคงมีการทำงานและเมตาโบลิสซึมสำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถสร้างสารประกอบรีดิวซ์สมมูลย์ (reducing equivalent compounds) เช่น NAD(P)H, $FADH_2$ ขึ้นภายในเซลล์ที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์สารเคมี 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นผลึกสีม่วง formazan ขึ้นมา ถ้ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นก็จะทำให้ความเข้มของสีน้ำเงินลดลง

ทำการศึกษาโดย นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาเติมด้วยสารลาย MTT ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาและได้ผลึกสารผลิตภัณฑ์ formazan ทำการละลายผลึก formazan ด้วยสารละลาย 0.1% DMSO นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือ Dual UV-VIS spectrophotometer ($\lambda_{540\ nm/630\ nm}$)

การวัดปริมาณธาตุเหล็กรูป non-heme iron ในเนื้อเยื่อตับ (Fischer 1964; Imbert-Bismut, Charlotte et al. 1999)

ปริมาณธาตุเหล็กสะสมในตับถือเป็นแหล่งมาตรฐาน (gold standards) ที่แสดงถึงสภาวะธาตุเหล็กในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แม้ว่าวิธี graphite-furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) เป็นที่ยอมรับสำหรับใช้ตรวจวัดปริมาณเหล็กในเนื้อเยื่อตับแต่ก็มีข้อบกพร่องบางประการ การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการทำให้เหล็กรูปเฟอรัส (Fe^{2+}) เกิดสีกับสาร 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)

น้ำยาเคมี

1) สารละลาย 1.5 M acetate buffer, pH 5.0
2) สารละลาย TPTZ reagent: ละลายสาร TPTZ ปริมาณ 0.1 กรัมในกรด conc. HCl ปริมาตรเล็กน้อย แล้วเติมสาร sodium acetate จำนวน 40 กรัม กรด glacial acetic acid ปริมาตร 29 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงไป ทำให้ละลายเข้ากันดี จากนั้นเติมสาร hydroxylamine hydrochloride ลงไป 3 กรัม
3) สารละลายเหล็กมาตรฐาน (2-10 μg/ml) เตรียมในกรด perchloric acid (1:10 dilution)

วิธีการทดลอง

ทำการอบแห้งเนื้อเยื่อตับในเตาเผาอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ชั่งเนื้อเยื่อตับแห้ง 100 มิลลิกรัม ทำการย่อยด้วยสารละลายกรดผสม (conc. HCl : conc. HNO_3 = 1:1, v/v) บน hot plate จนเห็นไอควันสีเหลืองเกิดขึ้น นำสาร ละลาย hydrolysate ที่ได้มาปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ผสมสารละลาย hydrolysate กับสารละลาย hydroxylamine hydrochloride (1:1, v/v) แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาทีเพื่อรีดิวซ์เฟอริกเป็นเฟอรัส ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลาย 1.5 M acetate buffer เติมสารละลาย TPTZ ลงไปทำ

ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำสารผลิตภัณฑ์สีม่วงที่เกิดขึ้นไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรเทียบกับสารละลาย sample blank (ไม่มี TPTZ) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณธาตุเหล็กในสารละลาย liver homogenate และนำไปคำนวณหาปริมาณธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับ (mg Fe/g liver tissue dry weight)

การตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี dye binding assay (Bradford 1976)

น้ำยาเคมี

1) น้ำยา BioRad Coomassie Brilliant blue (CBB) G250: ละลายสาร CBB G250 จำนวน 100 มิลลิกรัมในเมทธานอล 50 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว เติมกรด 85% H_3PO_4 ลงไป 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ก่อนนำไปใช้ให้ทำการเจือจาง 1:4 ด้วยน้ำกลั่น
2) สารละลายโปรตีน bovine serum albumin (BSA) มาตรฐานความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

นำสารละลายโปรตีนหรือสารละลาย hydrolysate (40 ไมโครลิตร) มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย CBB G250 (2.0 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิห้องนาน 10-15 นาที นำสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลาย bovine serum albumin (BSA)

การตรวจวัดปริมาณสาร MDA ในเนื้อเยื่อตับ (Chirico, Smith et al. 1993)

ชั่งเนื้อเยื่อตับอบแห้ง (100 มิลลิกรัม) นำมา homogenize กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าพีเอช 2.8) ที่มีสาร butyrated hydroxytoluene (BHT) ผสมอยู่ (50 ppm) นำ liver homogenate ที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 10% trichloroacetic acid ที่มีสาร butyrated hydroxytoluene (BHT) ผสมอยู่ (50 ppm) นำไปปั่นแยกตะกอนโปรตีนออกไป นำสารละลายใสที่ได้มาเติมกรดฟอสฟอริก (0.44 โมลาร์) และสารละลายกรดบาบิทูริค (1%) เขย่าผสมกันดี นำไปต้มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ทำให้เย็นลง เติมสารละลายบิวทานอล 1.5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าแรงๆให้ผสมกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดสารละลายผลิตภัณฑ์สีชมพูในชั้นบิวทานอลไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการหาค่าปริมาณสาร TBARS (MDA equivalent) โดยนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้สาร 1,1,3,3-tetramethoxypropane เป็นสารมาตรฐาน

การตรวจวัดปริมาณสาร Reduced glutathione ในเนื้อเยื่อตับ (Redegeld, van Opstal et al. 1988)

สารกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์ (reduced glutathione, GSH) ทำหน้าที่รีดิวซ์สาร 5, 5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) ให้เปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ที่มีสีเหลือง และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์โดยชั่งเนื้อเยื่อตับ (100 มิลลิกรัม) แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 5-sulfosalicylic acid solution (5%, w/v) เพื่อตกตะกอนโปรตีน ทำการปั่นเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกไป นำสารละลายใสที่มีสาร GSH มาทำปฏิกิริยากับน้ำยา DTNB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที นำสารผลิตภัณฑ์ (TNB) ที่เกิดขึ้นไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำการหาปริมาณสารกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การวัดปริมาณสาร hydroxyproline ของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อตับ (Reddy and Enwemeka 1996)

ชั่งเนื้อเยื่อตับอบแห้ง (100 มิลลิกรัม) นำมาย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 6 โมลาร์) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับค่าพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 6 โมลาร์) นำสารละลาย hydrolysate มาทำปฏิกิริยากับสารละลายออกซิไดซ์ (chloramines-T และ *n*-propanol ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติมสารละลาย Ehrlich's reagent ลงไป แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทำการหาค่าปริมาณ collagen โดยนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้สาร hydroxylproline (ความเข้มข้น 0 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสารมาตรฐาน

การตรวจสอบชิ้นเนื้อตับด้วยวิธี Histochemical techniques

นำเนื้อเยื่อตับมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (10 % neutral buffered formalin) หล่อในก้อนพาราฟีน นำไปตัดเป็นชิ้นเนื้อบางๆ (หนา 5 ไมครอน) ด้วยเครื่องมือ sliding microtome แล้วนำไปย้อมด้วยสีพิเศษคือ Hematoxylin and Eosin (H&E) stain เพื่อตรวจดูสัณฐานรูปร่างของเซลล์ตับซึ่งนิวเคลียสของเซลล์จะติดสีน้ำเงินเข้มและส่วนอื่นของเซลล์จะติดสีชมพู (Jimenez Brundelet 1973) และย้อมด้วยสี Perl's stain (hydrochloric acid-potassium cyanide) เพื่อตรวจดูปริมาณธาตุเหล็กซึ่งจะสังเกตเห็นตะกอนสีน้ำเงินบริเวณที่มีการสะสมธาตุเหล็ก (hemosiderin) ในเซลล์ตับ (Lillie 1976)

การวิเคราะห์ค่านัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean$\pm$SD หรือ mean$\pm$SEM และทำการวิเคราะห์ค่านัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี ANOVA หรือ Student *t*-test ซึ่งค่า $p<0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ