

ผลของอนุพันธ์เอชิลอะมิโนไพรีดีนและเอชิลอะนิลีนต่อหน้าที่
กระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

นางสาวหทัยรัตน์ เชื้อนเสน

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา


คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1222-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF ACYLAMINOPYRIDINE AND ACYLANILINE DERIVATIVES ON
RESPIRATORY CHAIN FUNCTION OF ISOLATED
RAT LIVER MITOCHONDRIA



Miss Hatairat Keansen

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Pharmacology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-1222-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนต่อหน้าที่
กระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว
โดย นางสาวหทัยรัตน์ เชื้อนเสน
สาขาวิชา เกษษวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญยงค์ ตันตีสิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. มยุรี ตันตีสิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนานู ภัทรพานิช)

สถาบันวิทย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หทัยรัตน์ เชื้อนเสน : ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนต่อหน้าที่
 กระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว (EFFECTS OF
 ACYLAMINOPYRIDINE AND ACYLANILINE DERIVATIVES ON RESPIRATORY
 CHAIN FUNCTION OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA.)อาจารย์ที่ปรึกษา :
 ผศ. วิทยา จันทสูตร, 91 หน้า. ISBN 974-17-1222-7

จากการศึกษาผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนซึ่งได้แก่ CU-18-11 และ CU-18-12 และ
 อนุพันธ์เอซิลอะนิลีนซึ่งได้แก่ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13 ต่อหน้าที่
 ที่กระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว พบว่าอนุพันธ์ดังกล่าวทั้ง 7 ตัว
 แสดงฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท
 แต่ไม่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจการหายใจ เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร
 ทั้ง 7 ตัวออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่ site I ของลูกโซ่การหายใจ การให้ร่วมกับ rotenone ไม่มีผล
 เปลี่ยนแปลงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจที่ site I ของลูกโซ่การหายใจของ rotenone ได้ และยัง
 พบว่าสารทั้ง 7 ตัวมีฤทธิ์กระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate ได้ซึ่ง CU-18-09 และ CU-18-10
 จะกระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate แรงกว่าอนุพันธ์ตัวอื่นในความเข้มข้น 10^{-4} M เท่ากันซึ่ง
 สารดังกล่าวออกฤทธิ์คล้าย uncoupler และนอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ในการกระตุ้นการออกซิเดชัน
 ของ succinate สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยแคดเมียม สำหรับอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนซึ่งได้แก่
 CU-18-12 และอนุพันธ์เอซิลอะนิลีน ซึ่งได้แก่ CU-18-09 และ CU-18-10 ออกฤทธิ์ยับยั้ง
 การหายใจที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมและ DNP ได้ และ อนุพันธ์เอซิลอะนิลีน ซึ่งได้แก่ CU-18-09
 และ CU-18-10 ยังสามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้

ภาควิชา..... ภาสัชวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา..... ภาสัชวิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา.....2545.....

4376640633 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORD : ACYLAMINOPYRIDINE / ACYLANILINE / RAT LIVER MITOCHONDRIA /
MITOCHONDRIA RESPIRATION

HATAIRAT KEANSEN : EFFECTS OF ACYLAMINOPYRIDINE AND ACYLANILINE
DERIVATIVES ON RESPIRATORY CHAIN FUNCTION OF ISOLATED RAT LIVER
MITOCHONDRIA. THESIS ADVISOR : ASIST. PROF. WITHAYA JANTHASOOT,
91 PP. ISBN 974-17-1222-7

The effects of acylaminopyridine derivatives (CU-18-11, CU-18-12) and acylaniline derivatives (CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13) on respiratory chain function were studied on isolated rat liver mitochondria. All of derivatives inhibited mitochondrial respiration when glutamate + malate but not succinate were used as substrates. The results suggested that CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12 and CU-18-13 acted as site I inhibitors of respiratory chain. These derivatives had no influence on site I inhibition by rotenone. Acylaminopyridine and Acylaniline derivatives stimulated succinate oxidation, particularly CU-18-09 and CU-18-10 were more potent than the others with equal concentration therefore these derivatives act as uncoupler. However, cadmium exerted an inhibitory effects of stimulated succinate oxidation from all derivatives. Calcium and DNP stimulated respiration were inhibited by acylaminopyridine derivative, CU-18-12 and acylaniline derivatives, CU-18-09 and CU-18-10. Aniline derivatives, CU-18-09 and CU-18-10 showed stimulatory effects on ATPase activity of mitochondria.

Department	PHARMACOLOGY.....	Student ' s signature.....
Field of study...	PHARMACOLOGY.....	Advisor ' s signature.....
Academic year2002.....	

กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์วิทยา จันทชูตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทุกด้าน ให้คำปรึกษาตลอดคำแนะนำ ความรู้และข้อคิดเห็นต่างๆ อย่างดียิ่งตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มยุรี ตันตีสิริระ หัวหน้าภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ของภาควิชาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช ที่กรุณาให้สารทดสอบ รวมทั้งคำปรึกษา และคำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอบพระคุณ คณาจารย์ ภาควิชาเกษตรศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำปรึกษาตลอดการศึกษาระดับปริญญาโทมาจนถึงระดับปริญญาเอกจนกระทั่งถึงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

และท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ท่านได้ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาและให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมห้องวิจัย รวมทั้งบุคคลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

หทัยรัตน์ เชื้อนเสน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
บทที่ 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
การหายใจของไมโทคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน.....	6
การสร้างพลังงานโดยไมโทคอนเดรีย.....	11
การสังเคราะห์ ATP โดยไมโทคอนเดรีย.....	19
การเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย.....	22
การขนส่งและการสะสมแคลเซียมโดยไมโทคอนเดรีย.....	26
บทที่ 3. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	29
สัตว์ทดลอง.....	29
การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี.....	29
เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา.....	30
การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับหนูขาว.....	30
การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง.....	33
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	33
การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ.....	35
การวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย.....	38
การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย.....	39
การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	40
บทที่ 4. ผลการวิจัย.....	41
1. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	41

สารบัญ (ต่อ)

2. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อการออกซิเดชันของ succinate.....	41
3. ผลของแคดเมียมต่อการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	42
4. ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง rotenone และอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย.....	42
5. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP.....	43
6. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+}	44
7. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	44
รูปและตารางประกอบการวิจัย.....	45
บทที่ 5. สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล	
1. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	80
2. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนต่อการออกซิเดชันของ succinate....	80
3. ผลของแคดเมียมต่อการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	80
4. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนกับ rotenone ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย.....	81
4. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP.....	81
5. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+}	82
6. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	82
7. ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีน.....	84
รายการอ้างอิง.....	86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	91

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดงลักษณะทั่วไปและประเภทของอนุพันธ์ของสารตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัย.....4
2	แสดงลักษณะเอนไซม์ต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย.....8
3	แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ 4 complexes ที่อยู่ภายในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย.....13
4	แสดง% Inhibition การหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 ของ CU-18-07, CU-18-08 , CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13.....55
5	แสดงความสามารถในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC ₅₀) ของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13.....55
6	แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10 ⁻⁴ M ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 4 เมื่อใช้ succinate เป็น สับสเตรท.....60
7	แสดงผลของ CdCl ₂ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10 ⁻⁴ M66
8	แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ของไมโตคอนเดรียของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10 ⁻⁴ M75
9	แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10 ⁻⁴ M ที่มีต่อ การหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วยแคลเซียม.....77
10	แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10 ⁻⁴ M ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....79
11	สรุปผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียและ ATPase activity.....83

สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
1 แสดงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีน ซึ่งได้แก่ CU 763-15-13, CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04)	2
2 แสดงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของสารในกลุ่มเอซิลอะมิโนไพริดีน(CU-18-11, CU-18-12) และเอซิลอะนิลีน(CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13).....	3
3 ภาพแสดง Biochemical anatomy of mitochondria.....	9
4 แสดงลักษณะโครงสร้างของไมโตคอนเดรียโดยรวม(A) และ โครงสร้างของ permeability transition pore (PTP)(B)	10
5 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของกระบวนการ Fuel breakdown, Krebs cycle, electron transport และ oxidative phosphorylation.....	14
6 แสดงลำดับการส่งผ่านอิเล็กตรอนของลูกโซ่การหายใจและการสร้างพลังงานโดย ATPsynthase.....	16
7 ภาพแสดงการสร้างพลังงานที่ได้จากกระบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งเกิดควบคู่กับการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่อธิบายโดย chemiosmotic coupling hypothesis.....	17
8 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆที่เกี่ยวข้องการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสวงไว้ (high energy electrochemical proton gradient) และตำแหน่งที่ตัวยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียไปออกฤทธิ์.....	18
9 ภาพแสดงโครงสร้างระดับ submitochondria compartment และโครงสร้าง ATPsynthase.....	20
10 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ ATPsynthase.....	21
11 แสดงตำแหน่งที่สารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน.....	25
12 แสดงการขนส่งแคลเซียม (Ca ²⁺) ในไมโตคอนเดรีย.....	27
13 แสดงการขนส่งแคลเซียม (Ca ²⁺) โดยไมโตคอนเดรียโดยกระบวนการต่างๆ.....	28
14 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้ differential centrifuge.....	32
15 แสดง Gilson ' s oxygraph chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	34
16 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงการหา RCI.....	37
17 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียระยะต่างๆ.....	37
18 กราฟแสดง oxygraph tracing การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย.....	46
19 % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-07 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ความเข้มข้น 10 ⁻⁷ ถึง 10 ⁻³ M.....	48

สารบัญญภาพ (ต่อ)

20	% Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-08 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M.....	49
21	% Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-09 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M.....	50
22	% Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-10 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M.....	51
23	% Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-11 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M.....	52
24	% Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-12 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M.....	53
25	% Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-13 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M.....	54
26	แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย succinate (Succinate oxidation).....	56
27	ผลของแคดเมียม (Cd^{2+}) [Succinate oxidation inhibitor] ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	61
28	แสดงผลของ rotenone ต่อการออกฤทธิ์ร่วมกับ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M.....	67
29	แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อ การหายใจที่กระตุ้นด้วย DNP.....	72
30	แสดง % Inhibition ของ CU-18-09 ที่มีต่อการหายใจที่กระตุ้นด้วย DNP.....	73
31	แสดง % Inhibition ของ CU-18-10 ที่มีต่อการหายใจที่กระตุ้นด้วย DNP.....	74
29	แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ที่มีต่อ การหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วยแคลเซียม (Calcium-stimulated respiration) ความเข้มข้น 10^{-4} M เมื่อใช้ glutamate + malate.....	76
30	แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	78

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADP	=	adenosine 5' -diphosphate
ATP	=	adenosine 5' -triphosphate
ATPase	=	adenosine triphosphatase
BSA	=	bovine serum albumin
Ca ²⁺	=	calcium ion
CaCl ₂	=	calcium chloride
CCCP	=	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CoQ	=	coenzyme Q, ubiquinone
CuSO ₄	=	copper sulfate
Cyt.	=	cytochrome
°C	=	degree Celsius
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTT	=	dithiothreitol
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether) N,N,N',N',-tetra acetic acid
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH ₂	=	reduced flavin adenine dinucleotide
FMN	=	flavin mononucleotide
Fe-S	=	iron-sulfur center
g	=	centrifugal force unit (gravity)
H ⁺	=	proton
HCl	=	hydrochloric acid
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid
H ₂ O ₂	=	hydrogen peroxide
H ₂ SO ₄	=	sulfuric acid
IC ₅₀	=	median inhibitor concentration
K ⁺	=	potassium ion
KCl	=	potassium chloride

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

Kg	=	Kilogram
K_2HPO_4	=	potassium phosphate
M	=	Molar
MAO	=	monoamine oxidase
MAO-A	=	monoamine oxidase A
MAO-B	=	monoamine oxidase B
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
μ atoms	=	microatoms
μ g	=	microgram
μ l	=	microlite
μ M	=	micromolar
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
mOsm	=	milliosmolar
NAD^+	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Na_2CO_3	=	sodium carbonate
NaOH	=	sodium hydroxide
n atoms	=	nanoatoms
ng	=	nanogram
O_2	=	oxygen
O_2^-	=	superoxide anion radical
OH^-	=	hydroxyl ion
Pi	=	inorganic phosphate
RCI	=	respiratory control index
RPM	=	revolution per minute
SE	=	standard error of mean
TCA	=	trichloroacetic acid
TMPD	=	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

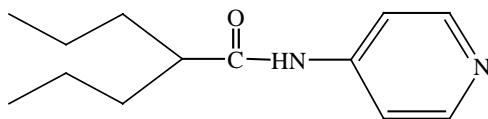
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

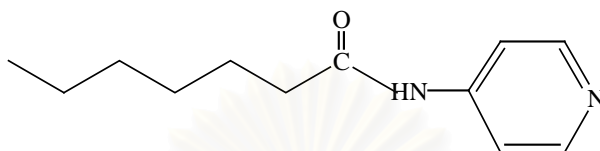
จากการศึกษาผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนซึ่งได้แก่ CU 763-15-13 (รูปที่ 1) ต่อหน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดยอุณหภูมิต่ำ (2541) พบว่าสารดังกล่าวออกฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 เมื่อใช้ NAD^+ -linked substrates ซึ่งได้แก่ glutamate + malate, α -ketoglutarate และ β -hydroxybutyrate โดยออกฤทธิ์ยับยั้งที่ site I ของลูกโซ่การหายใจและยังยับยั้ง state 3u อีกด้วยในขณะเดียวกันพบว่า CU 763-15-13 สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ succinate ได้ นอกจากนี้สารดังกล่าวยังออกฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียมโดยไม่มีผลต่อ ATPase activity

ซึ่งต่อมา อัญชิษฐา ทิพวงศวิจิตร (2543) ได้ศึกษาผลของสารในกลุ่มเอซิลอะมิโนไพริดีนตัวอื่นๆ ได้แก่ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 (รูปที่ 1) ต่อหน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรียพบว่าสารดังกล่าวจะออกฤทธิ์คล้ายกันคือ ยับยั้งการส่งผ่าน electron ในลูกโซ่การหายใจโดยออกฤทธิ์ยับยั้งที่ site I เมื่อใช้ NAD^+ -linked substrates และกระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate แต่ไม่มีผลต่อ ATPase activity ส่วนผลต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียมจะแตกต่างกันโดย CU 763-16-04 จะแสดงผลในทางยับยั้ง ส่วน CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 ไม่มีผลยับยั้ง ส่วน CU 763-18-02 จะเสริมฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจด้วยแคลเซียม สำหรับผลต่อเอนไซม์ MAO (Monoamine oxidase) พบว่าสารทั้ง 4 ตัวออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้

ต่อมาได้มีการพัฒนาสูตรโครงสร้างอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีน ซึ่งได้แก่ CU-18-11, CU-18-12 และ อนุพันธ์เอซิลอะมิโนได้แก่ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13 (รูปที่ 2) โดยผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช และคณะ ซึ่ง Tatiya Thanomdee (2002) ได้ทำการศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อเอนไซม์ MAO ซึ่งพบว่าสารทุกตัวออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้ง MAO-A และ MAO-B ด้วยความแรงที่ต่ำกว่า clorgyline และ selegiline ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO สำหรับวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียและการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของสารที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ซึ่งคาดว่าข้อมูลที่ได้จะใช้เป็นประโยชน์ในการเป็นแนวทางในการพัฒนาสารต่อไป

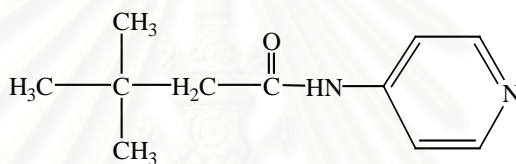


CU 763-15-13

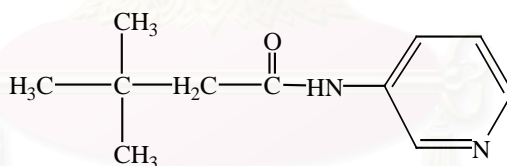


CU 763-16-04

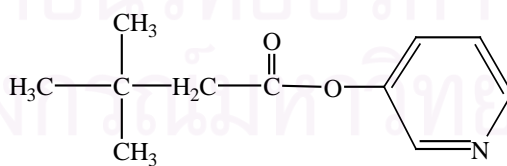
(CU-18-12)



CU 763-18-01

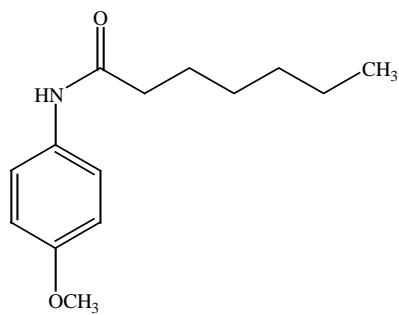


CU 763 18-02

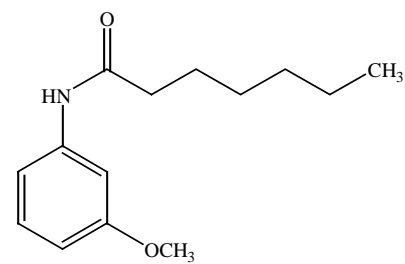


CU 763-18-04

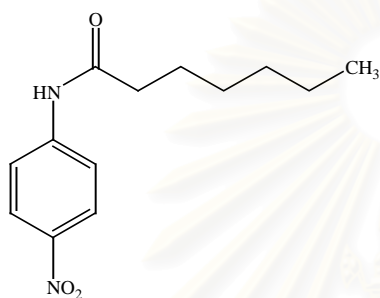
รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์เอซิลอะมีนไพริดีน ซึ่งได้แก่ CU 763-15-13, CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04



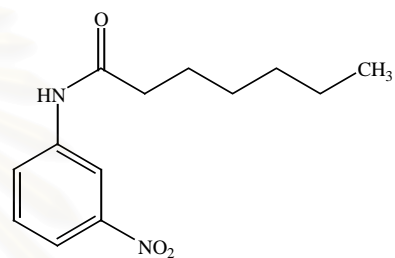
CU-18-07



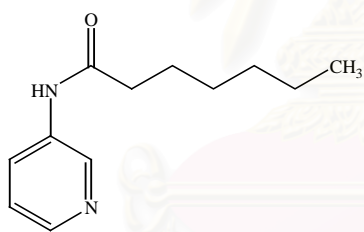
CU-18-08



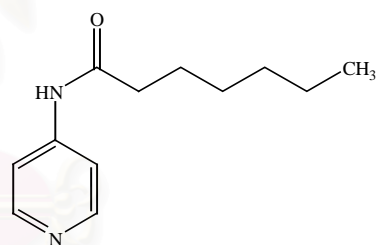
CU-18-09



CU-18-10

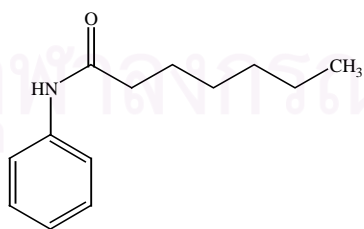


CU-18-11



CU-18-12

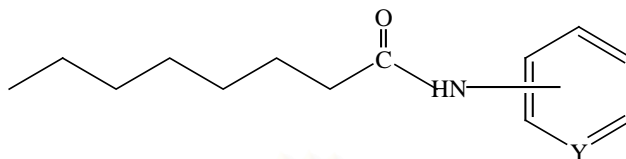
(CU 763-16-04)



CU-18-13

รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ในกลุ่มเอซิลอะมิโนไพริดีน (CU-18-11, CU-18-12) และเอซิลอะนิลีน (CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13)

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทั่วไปและประเภทของอนุพันธ์ของสารตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัย



สารตัวอย่าง	กลุ่ม	น้ำหนักโมเลกุล	การแทนที่ตำแหน่ง Y	ตำแหน่งที่มีการแทนที่
CU-18-07	เอซิลอะนิลีน	235	C-OCH ₃	Para
CU-18-08	เอซิลอะนิลีน	235	C-OCH ₃	Meta
CU-18-09	เอซิลอะนิลีน	250	C-NO ₂	Para
CU-18-10	เอซิลอะนิลีน	250	C-NO ₂	Meta
CU-18-11	เอซิลอะมิโนไพริดีน	205	N	Meta
CU-18-12 (CU 763-16-04)	เอซิลอะมิโนไพริดีน	205	N	Para
CU-18-13	เอซิลอะนิลีน	203	None	None

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

ศึกษาผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนต่อหน้าที่กระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย

สมมุติฐาน

อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนมีผลกระตุ้นหรือยับยั้งหน้าที่กระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ดูผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนต่อหน้าที่กระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย
2. หาตำแหน่งของกระบวนการหายใจที่ถูกกระตุ้นหรือยับยั้งโดยอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน
3. ดูผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลเบื้องต้นถึงผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนต่อหน้าที่กระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียเพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทำวิจัยไปเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การหายใจของไมโทคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (Mitochondria respiration and oxidative phosphorylation)

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนล (organelle) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ โดยไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งสำคัญที่สุดในการสร้าง ATP (adenosine triphosphate) เป็น high energy compound ซึ่งมีหลายปฏิกิริยาชีวเคมีที่สำคัญต่างๆ ที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย เช่น ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของกรดไขมัน (fatty acid oxidation), ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของกรด อะมิโน (amino acid oxidation), ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle หรือ citric acid cycle) ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) ผลที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าว จะให้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic eukaryotic) พลังงานดังกล่าวจะสังเคราะห์จากกระบวนการที่เรียกว่า oxidative phosphorylation ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย (inner membrane) (Avers, 1986 ; Hodgson and smart, 2001 ; Voet, Voet, and Pratt, 1999 ; Garrette and Grisham, 2002)

ไมโทคอนเดรียพบได้ใน eukaryotic cell ทุกชนิด ไมโทคอนเดรียจะมีความยาวประมาณ 3 ไมครอนและกว้างประมาณ 0.5-1.0 ไมครอน มีรูปร่างที่แตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ เช่น มีลักษณะกลม (spherical) ในเซลล์ตับจนถึง แท่งยาว (elongated rod or filaments) ในเซลล์ไต ส่วนใน fibroblast จะมีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (threadlike) บางครั้งอาจมีโครงสร้างที่ซับซ้อนในเยื่อหุ้ม นอกจากนี้จำนวนและขนาดที่พบจะแตกต่างกันไป ใน human spermatozoa จะมีจำนวนไมโทคอนเดรียที่คงที่คือ 16 ไมโทคอนเดรียต่อเซลล์ ส่วน oocyte มีจำนวนมากถึง 100,000 ไมโทคอนเดรียต่อเซลล์ และอวัยวะที่ทำหน้าที่หนักในร่างกาย (very active metabolically organ) เช่น ตับ, กล้ามเนื้อ, สมอง, หัวใจ และ กล้ามเนื้อลาย จะมีไมโทคอนเดรียอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งมักจะไวต่อยาหรือพยาธิสภาพของโรค มักจะพบไมโทคอนเดรียอยู่ใกล้เซลล์ที่ต้องการ ATP หรือใกล้กับแหล่งของเชื้อเพลิง (fuel) ที่ใช้ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต่างๆ ถึงแม้ว่าไมโทคอนเดรียจะมีขนาด รูปร่างและจำนวนแตกต่างกันออกไป แต่จะมีโครงสร้างที่เหมือนกันกล่าวคือ ผนังของไมโทคอนเดรียเป็น lipid bilayer membrane มีอยู่ 2 ชั้น คือ ผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) ช่องว่างระหว่างผนังชั้นนอกและผนังชั้นในเรียกว่า intermembrane space ผนังของไมโทคอนเดรียชั้นในจะหุ้มห่อส่วนของช่องเหลวที่มีลักษณะเป็นคล้ายเจลหรือ semi-fluid ที่เรียกว่าเมตริกซ์ (matrix) (รูปที่ 3)

ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมีความแตกต่างกันในแง่ของส่วนประกอบทางเคมี (chemical composition), permeability และเอนไซม์ (enzyme content) ผนังชั้นนอกจะมีลักษณะของผิวที่เรียบ (smooth and unfold) หุ้มผนังชั้นนอกประกอบด้วยสารจำพวกไขมันเป็นส่วนใหญ่ คุณสมบัติของผนังชั้นนอกจะยอมให้สารที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 datons เช่น ADP, ATP, sucrose รวมทั้งอิออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ ที่ผนังชั้นนอกยังมี pore ที่มีลักษณะเป็นโปรตีนที่เรียกว่า porin หรือ voltage - dependent anion channel (VDAC) ซึ่งให้ polar compounds ผ่านเข้าออกได้ระหว่างไซโตซอล (cytosol) กับไมโทคอนเดรียและในโครงสร้างจะเห็นว่ามี

ส่วนที่เชื่อมติดต่อกันระหว่างผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมีชื่อว่า contact site และที่บริเวณนี้จะมีโครงสร้างคล้ายท่อที่เรียกว่า mitochondria permeability transition pore (PTP) ซึ่งในสภาพที่เปิดจะยินยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจนถึงน้ำหนักโมเลกุล 1500 สามารถผ่านเข้าออกระหว่างเมตริกซ์กับไซโตซอลอย่างอิสระ เอนไซม์ที่อยู่ผนังชั้นนอกคือ monoamine oxidase ซึ่งจะใช้เป็น marker ของผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 4)

ผนังชั้นในจะยึดหยุ่นและมีพื้นที่ผิวมากกว่าเนื่องจากการพับเข้าไปในเมตริกซ์ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า cristae เพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้มากขึ้น ส่วนภายในผนังชั้นในจะประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนเป็นส่วนใหญ่และไขมันเป็นส่วนน้อย มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารและอิออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ (impermeable) แต่จะยอมให้เฉพาะ O_2 , CO_2 , H_2O และ NH_3 ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ ส่วนสารจำพวก hydrophilic metabolites และ inorganic ions ทั้งหมดที่เป็น biological importance ก็สามารถผ่านผนังของไมโทคอนเดรียได้โดยอาศัย specific channels และ carrier protein ที่มีอยู่ที่ผนังชั้นใน ส่วน phosphate (Pi), adenine nucleotides ADP และ ATP และสาร respiratory substrates จำพวก mono-, di- และ tricarboxylates โดยทั่วไปแล้วการทำงานของ transport protein เหล่านี้ทำงานในลักษณะแลกเปลี่ยน (exchange mode) เช่น ADP แลกเปลี่ยนกับ ATP, Pi แลกเปลี่ยนกับ OH^- เป็นต้น ผนังชั้นในจะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่มีหน้าที่เฉพาะ ได้แก่ respiratory chain enzyme และ enzyme ATPsynthase ส่วนในเมตริกซ์ นอกจากจะประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ ของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครบส์แล้วยังประกอบด้วย DNA, ribosome และเอนไซม์ที่ catalyze transcription และ translation ของยีน ดังแสดงรายละเอียดดังตารางที่ 2

ไมโทคอนเดรียมี DNA ของตนเองมีลักษณะเป็น circular DNA ที่บรจคำสั่ง (encodes) ของ polypeptide chains ประมาณ 24 polypeptides ซึ่งมีส่วนร่วมต่างๆ เช่น subunits ใน complex ต่างๆ ของลูกโซ่การหายใจและส่วนประกอบจำเป็นอื่นๆ ของ energy-coupling machinery อย่างไรก็ตามโปรตีนส่วนใหญ่ของไมโทคอนเดรียมาจากคำสั่งของ nuclear DNA และสังเคราะห์นอกไมโทคอนเดรียแล้วถูกนำเข้าสู่ไมโทคอนเดรียโดยกลไกที่ซับซ้อน

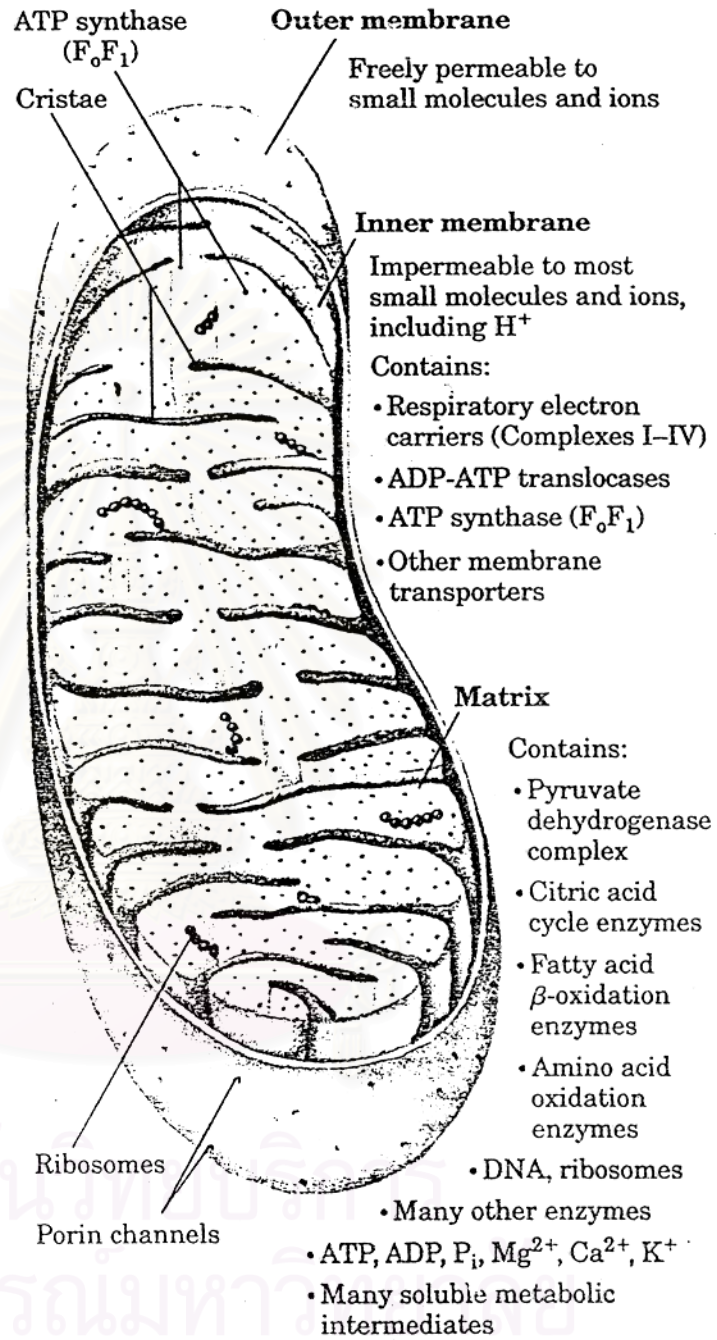
นอกจากนี้แล้วยังพบว่าไมโทคอนเดรียยังเป็นออกาเนล ที่สร้าง " reactive oxygen species " (ROS) เช่น superoxide anion radical O_2^- , hydrogen peroxide H_2O_2 และ extremely reactive hydroxyl radical $HO\cdot$. โดยทั่วไปแล้ว ROS จะเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง complex III เนื่องจากมีการหมุนเวียนของ proton ระหว่าง ubiquinone, cytochrome b-c₁ และ iron-sulfur protein ส่วน complex I ก็มีส่วนร่วมอยู่บ้าง reactive oxygen species ที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปถือว่าเป็นสารอันตราย (toxic metabolites) ซึ่งจะต้องถูกทำลายไปโดยเอนไซม์เฉพาะ เช่น catalase, peroxidase และ superoxide dimutase แต่ส่วนที่ยังเหลือจากการทำลายก็จะมีผลเสียต่อไมโทคอนเดรียและเซลล์โดยรวม ซึ่งแสดงออกโดยลำดับ (cascade) ของเหตุการณ์ต่างๆ ที่นำไปสู่การตายของเซลล์ที่เรียกว่า " apoptosis "

จากร่องรอยโดยย่อเกี่ยวกับการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียซึ่งทำให้เห็นการเกี่ยวข้องกันในวิถีต่างๆ ระหว่าง mitochondrial metabolic routes กับกระบวนการอื่นของเซลล์โดยรวม ดังนั้นตัวยา, สารเคมีซึ่งมีผลต่อ intramitochondria metabolic process หรือ transport pathways ที่เป็นจุดเชื่อมไมโทคอนเดรียกับไซโตซอลก็อาจมีผลต่อ cell metabolism ไมโทคอนเดรียจึงได้ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบ (model) ในการศึกษาเกี่ยวกับประเด็นต่างในการวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพเช่น apoptosis, oxidative stress, aging และ degenerative

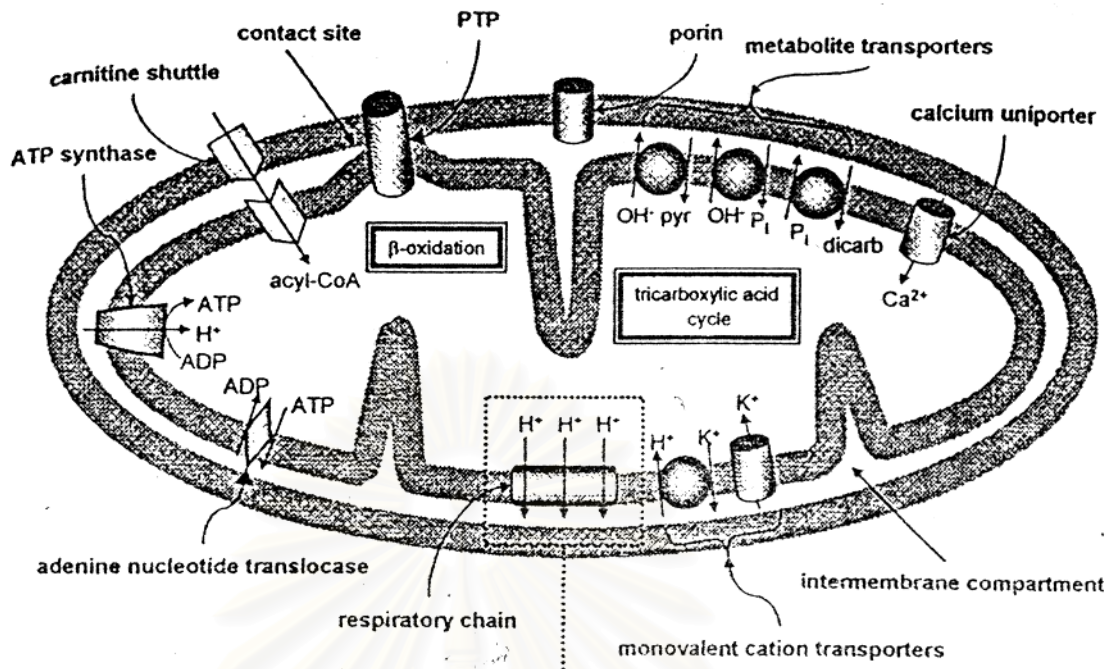
disease เป็นต้น (Avers,1986 ; Voet et al.,1999 ; Harper et al., 2000 ; Lehninger, Nelson and Cox, 2000 ; Szewczyk and Wojtczak, 2002)

ตารางที่ 2 แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโทคอนเดรีย (Devlin,1997)

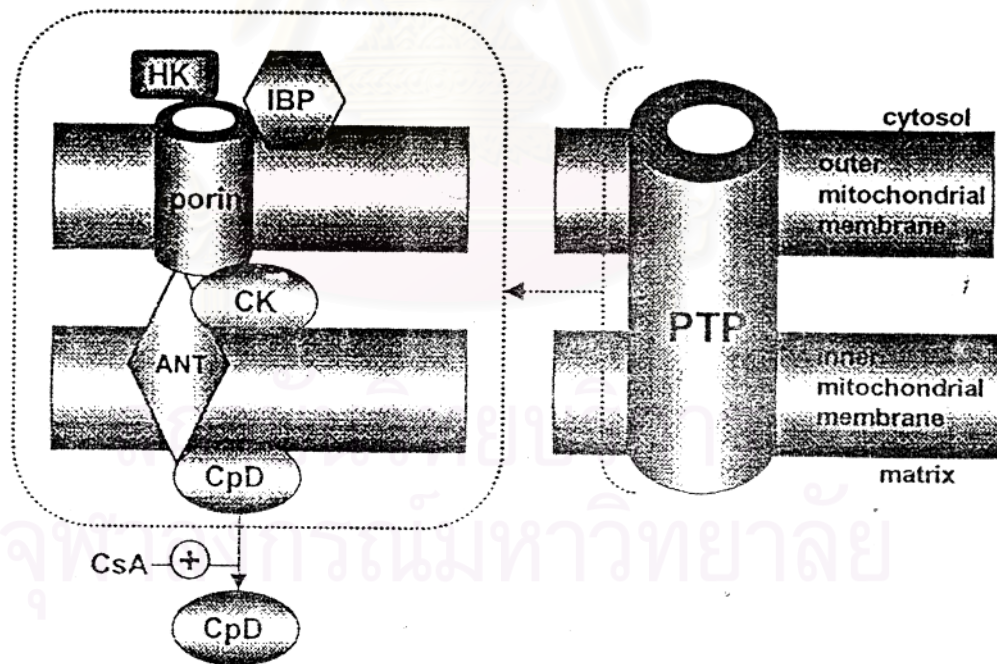
Outer Membrane	Intermembrane space	Inner membrane	Matrix
Monoamine oxidase	Adenylate kinase	Succinate	Pyruvate
Kynurenine hydroxylase	Nucleoside	dehydrogenase	dehydrogenase
Nucleoside diphosphate	Diphosphate	F1-ATPase	Citrate synthase
kinase	kinase	NADH	Isocitrate
Phospholipase A		dehydrogenase	dehydrogenase
Fatty acyl CoA		β -Hydroxybutyrate	α -Ketoglutarate
synthetases		dehydrogenase	dehydrogenase
NADH: cytochrome - c		Cytochromes	Aconitase
reductase		b,c ₁ ,c,a,a ₃	Fumarase
(rotenone- insensitive)		Carnitine :acyl-CoA	Succinyl-CoA
Choline		translocase	synthetase
phosphotransferase		Mono-,di-and	Malate dehydrogenase
		tricarboxylate	Fatty acid β -oxidation
		translocase	system
		Glutamate-aspartate	Glutamate
		translocase	dehydrogenase
			Glutamate-oxaloacetate
			transaminase
			Ornithine transcarba-
			moylase



รูปที่ 3 แสดง Biochemical anatomy of mitochondria (Lehninger et al., 2000)



(B)



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของไมโทคอนเดรียโดยรวม (A)

แสดงโครงสร้างของ permeability transition pore (PTP) (B)

(Szewczyk and wojtczak, 2002)

กระบวนการสร้างพลังงานโดย ไมโทคอนเดรีย

การสร้างพลังงานของ ไมโทคอนเดรีย เริ่มจากสารอาหารต่างๆ ที่รับประทานเข้าไป ซึ่งได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ถูกย่อยสลายให้ได้โมเลกุลเล็ก เช่น โปรตีนจะถูกย่อยไปเป็น amino acid , คาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยได้เป็น mono saccharide เช่น กลูโคสและไขมันถูกย่อยได้เป็น fatty acid และสารโมเลกุลเล็กเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึม เพื่อให้ได้ acetyl CoA (acetyl coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวกลาง(intermediates) ที่สำคัญเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Kreb' s cycle) acetyl CoA จะถูกออกซิไดส์ต่อไปโดยผ่านปฏิกิริยาต่างๆ ในวัฏจักรเครบส์ สุดท้ายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ และมีไฮโดรเจน (H) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ไพรีดิวซ์ (reduce) NAD^+ และ FAD ไปเป็น $\text{NADH}+\text{H}^+$ และ FADH_2 ซึ่งเป็น reducing equivalents ที่สำคัญ และจะถูกส่งเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain หรือ electron transport chain) ซึ่งจะอยู่ในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียโดยผ่านสารที่เป็นตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนหลายชนิด (Cambell, 1995 ; Devlin, 1997 ; Lehninger et al., 2000 ; Garrett and Grisham, 2002) (รูปที่ 5) ได้แก่

1. Pyridine-linked dehydrogenase ได้แก่ β -hydroxybutyrate dehydrogenase , glutamate dehydrogenase , malate dehydrogenase, เป็นต้น ซึ่งต้องการ NAD^+ หรือ NADP^+ ตัวใดตัวหนึ่งเป็น coenzyme ยกเว้น glutamate dehydrogenase ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง NAD^+ และ NADP^+

2. Flavin-linked dehydrogenase หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า flavoprotein ประกอบด้วย FMN (flavin mononucleotide) เป็น prosthetic groups ในการรับ ส่งอิเล็กตรอน ได้แก่ NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase ,dihydrolipoyl dehydrogenase ซึ่ง Flavin-linked dehydrogenase จะแตกต่างจาก Pyridine –linked dehydrogenase ตรงที่จะจับกับเฮมไซม์ที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น prosthetic groups มากกว่าที่จะจับกับ coenzyme

3. Iron-sulfur protein ประกอบด้วยเหล็ก (iron และ acid –labile sulfur) ได้แก่ ferredoxin

4. ระบบ cytochromes ประกอบด้วย iron-porphyrin เป็น prosthetic groups ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก dehydrogenase system ต่างๆ ไปยังโมเลกุลออกซิเจน ได้แก่ cytochromes b, c₁, c, a, a₃

5. Coenzyme Q หรือ Ubiquinone เป็นสารตัวกลางที่ไม่ใช่โปรตีน เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ สามารถเคลื่อนที่อย่างอิสระได้ในชั้นไขมันสามารถรับและให้อิเล็กตรอนได้ นอกจากนี้ยังสามารถรับ H^+ จากสารละลายตัวกลางพร้อมกันกับรับส่งอิเล็กตรอนได้

สับสเตรทที่ไมโทคอนเดรียสามารถ ออกซิไดซ์และทำให้มีการส่งผ่าน electron เข้าสู่ตำแหน่งต่างๆของลูกโซ่การหายใจแบ่งเป็น 2 พวก คือ

1. NAD^+ - linked substrates เช่น glutamate, malate, pyruvate, α -ketoglutarate เป็น substrates ที่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาในไมโทคอนเดรียโดย Krebs'cycle จะปลดปล่อย ไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไพรีดิวซ์ NAD^+ ได้เป็น $\text{NADH}+\text{H}^+$ ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I

2. **FAD-linked substrates** ได้แก่ succinate ไฮโดรเจนที่ปลดปล่อยออกมาจะไปรีดิวซ์ FAD เป็น FADH_2 ให้ electron เข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Mathews and Holde, 1990 ; Lehninger et al., 2000)

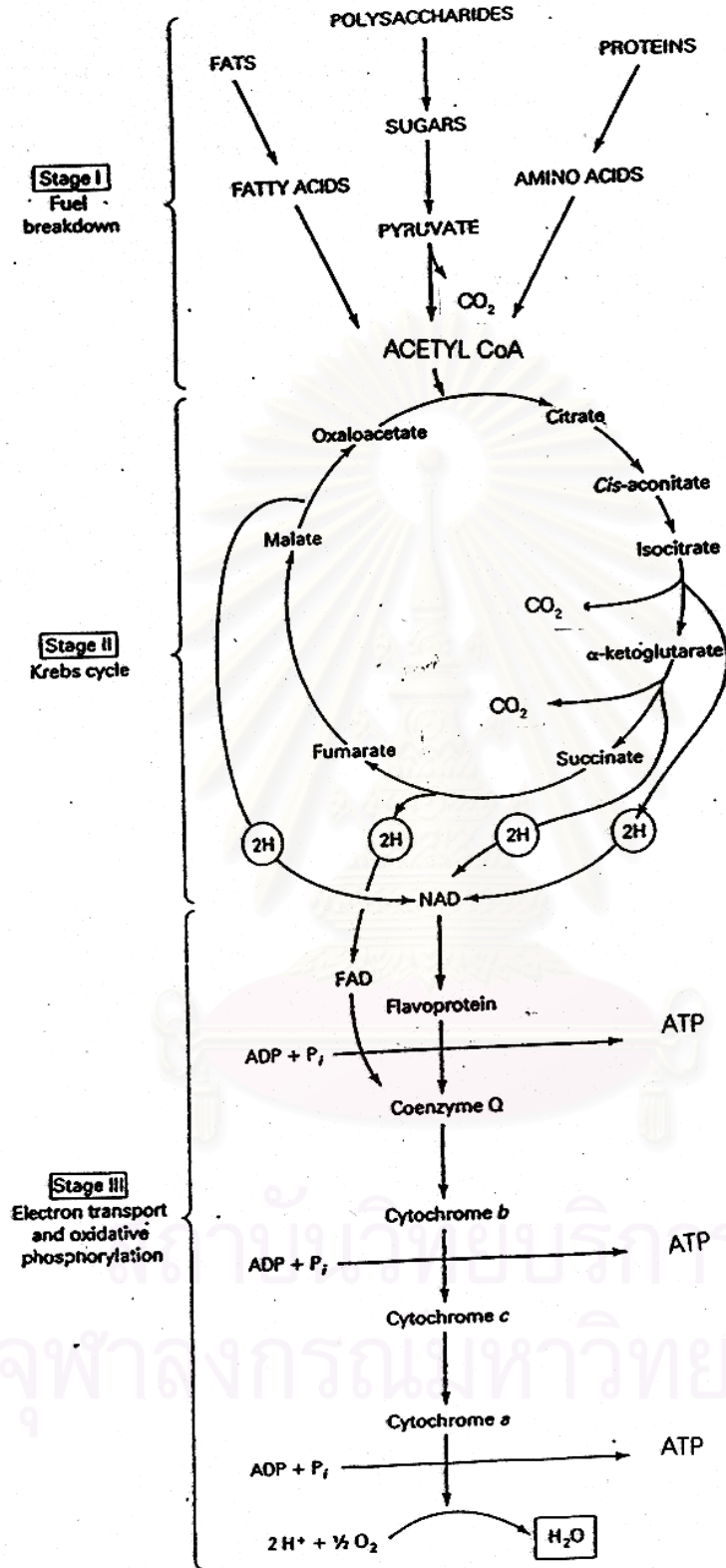
ลูกโซ่การหายใจแบ่งออกเป็น 4 complex คือ (Hatefi, 1985 ; Lehninger et al., 2000 ; Wallace and Starkov, 2000)

1. **Complex I** หรือ NADH dehydrogenase complex: ubiquinone oxidoreductase
ซึ่งจะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADH ไปยัง ubiquinone ,fericyanide, และ NAD^+
2. **Complex II** หรือ Succinate dehydrogenase complex : ubiquinone oxidoreductase
จะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก succinate ไปยัง ubiquinone
3. **Complex III** หรือ Cytochrome bc_1 - complex: cytochrome c oxidoreductase
จะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก dihydroubiquinone (QH_2) ไปยัง cytochrome c
4. **Complex IV** หรือ Cytochrome oxidase complex หรือ Ferrocycytochrome C : oxygen oxidoreductase
จะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังโมเลกุลออกซิเจน

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจจาก NADH หรือ FADH_2 ไปยังออกซิเจน โดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนหลายชนิดจะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมาจำนวนหนึ่งซึ่งมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP โดยการ phosphorylate ของ ADP กระบวนการทั้งหมดที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า กระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (Oxidative phosphorylation) ในลูกโซ่การหายใจจะมีอยู่ 3 ตำแหน่งที่มีการปลดปล่อยพลังงานอิสระมีมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP คือ complex I, III และ IV ซึ่งตรงกับ site I, site II และ site III ตามลำดับ (รูปที่ 6) ในสภาวะปกติพบว่าการส่งผ่านอิเล็กตรอนและการสังเคราะห์ ATP จะต้องเกิดควบคู่กัน (tightly coupled) แต่ในบางกรณี ทั้งสองกระบวนการอาจเกิดแยกจากกันได้ เช่น กรณีที่ไม่โตคอนเดรียที่เตรียมได้มีคุณภาพไม่ดี หรือเก็บนานเกินไป (aging mitochondria) หรือ กรณีที่ไม่โตคอนเดรีย ได้รับสารบางอย่าง เช่น uncouplers ตัวอย่างเช่น DNP (2,4 dinitrophenol) หรือ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) ซึ่งสารประเภทนี้สามารถกระตุ้นให้ไม่โตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ substrate ในลูกโซ่การหายใจอย่างอิสระและรวดเร็วโดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า uncoupling (Lehninger et al., 2000)

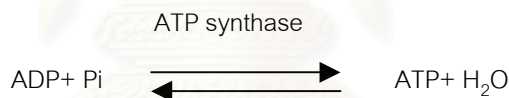
ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ 4 complexes ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย (Aver,1986)

Complexes	Component
I NADH dehydrogenase complex	NAD FMN Iron sulfur (FeS) centers Coenzyme Q ₁₀ Phospholipids
II Succinate dehydrogenase complex	FAD Iron sulfur (FES) centers
III Cytochrome b - c ₁ complex	Cytochrome b ₅₅₈ Cytochrome b Cytochrome c ₁ Nonheme iron protein Ceenzyme Q ₁₀ Phospholipids
IV Cytochrome oxidase complex	Cytochrome a Cytochrome a ₃ Copper Phospholipids



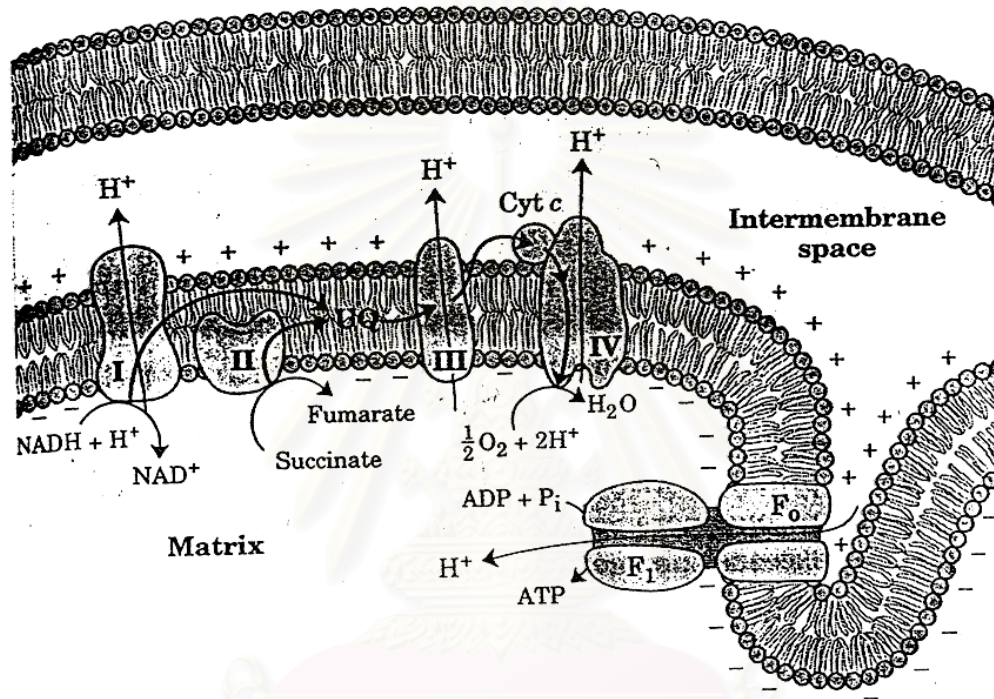
รูปที่ 5 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของกระบวนการ Fuel breakdown, Kreb' cycle, Electron transport และ ปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation (De Robertis, E.D.P. and De Robertis, E.M.F., 1987)

แม้ว่าการสังเคราะห์ ATP ใน ไมโตคอนเดรีย จำเป็นต้องใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่กลไกที่แท้จริงในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าใช้พลังงานที่เกิดจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจนั้นน่าจะมีการสงวนไว้ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ซึ่งมีหลายสมมุติฐานเพื่อใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์เช่น chemical coupling , conformational coupling และ chemiosmotic coupling hypothesis แต่ปัจจุบันแนวความคิดที่เป็นที่ยอมรับคือ chemiosmotic coupling hypothesis ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ในปี 1961 (Boyer et.al.,1977 ; Mitchell,1977 ; Avers,1986 ; Campbell,1995 ; Harper, 2000) (รูปที่ 7) ซึ่งได้เสนอว่า ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจจะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในการผลักดัน (pump) โปรตรอน (H^+) จากเมตริกซ์ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ออกไปยัง intermembrane space ทำให้เกิดความแตกต่างของประจุหรือเกิด proton gradient ขึ้น จากการที่มีความแตกต่างของระดับ H^+ ระหว่างเมตริกซ์กับ intermembrane space และเนื่องจาก H^+ มีประจุบวกจึงทำให้มีความแตกต่างระหว่างประจุชั้นที่ผนังชั้นในทำให้เกิด electrical gradient ซึ่งรวมเรียกว่า electrochemical proton gradient ($6\mu H^+$) หรือ proton motive force และจะเกิดขึ้นได้ต้องเป็น intact ไมโตคอนเดรีย คือ สามารถควบคุมการเคลื่อนที่เข้าออกของโปรตรอนได้ซึ่ง electrochemical proton gradient จะเป็นส่วนที่ทำให้พลังงานและผลักดันให้มีการสังเคราะห์ ATP จาก ADP และ P_i โดยโปรตรอนจาก intermembrane space จะผ่านกลับเข้าสู่เมตริกซ์ทางเอนไซม์ ATP synthase (F_1F_0 -ATPase) เกิดการ phosphorylate ADP ทำให้ได้ ATP ขึ้นมาดังสมการ

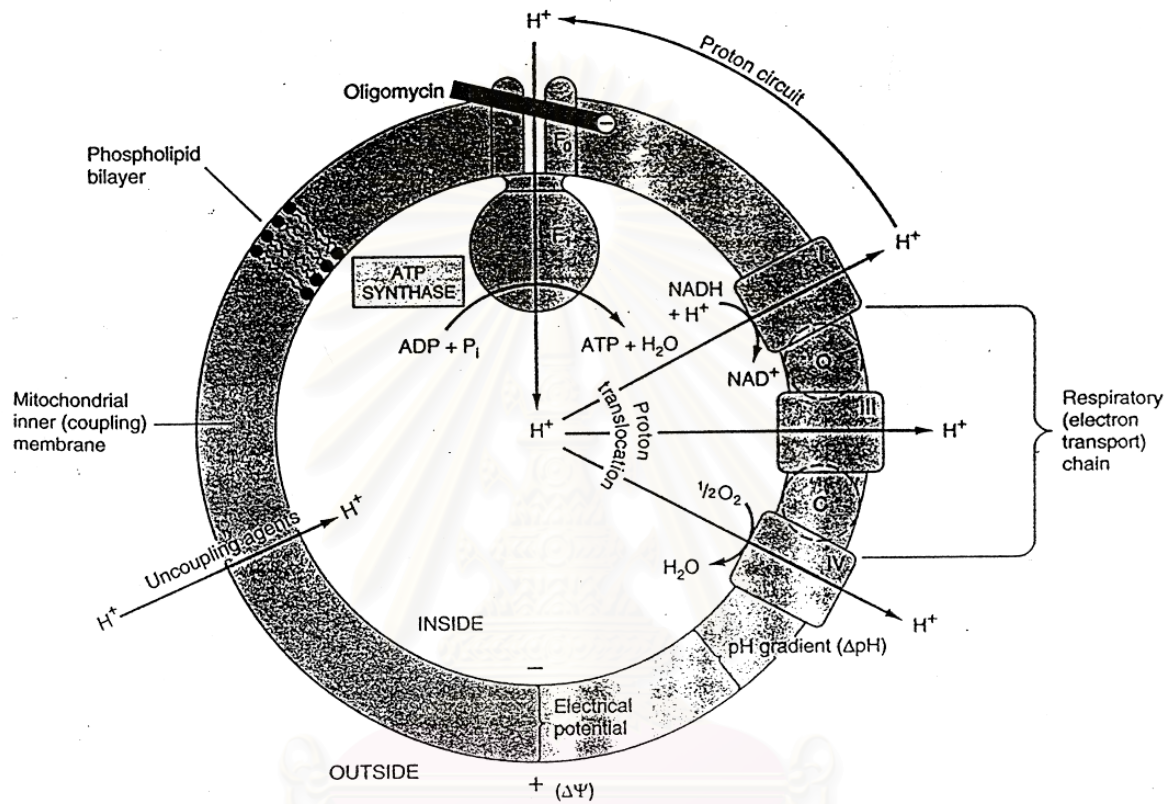


ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ระหว่างการ synthesis และ hydrolysis ซึ่งพบว่า สารใดก็ตามที่ทำให้เกิดภาวะ uncoupling ของไมโตคอนเดรีย คือทำให้ oxidation และ phosphorylation แยกออกจากกัน เช่น uncoupler (DNP) จะมีผลทำให้ $6\mu H^+$ เสียไปในสภาวะเช่นนี้จะกระตุ้นให้มีการสลาย ATP (ATP hydrolysis) ซึ่งเป็นผลจาก ATPase activity ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถวัด ATPase activity ได้โดยการวัดปริมาณ P_i ที่เกิดจากการสลาย ATP (Danishefsky,1980)

พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสงวนไว้จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในรูปของ $6\mu H^+$ นอกจากจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP แล้วยังสามารถนำไปใช้ในกระบวนการอื่นๆ เช่น ใช้ในการขนส่งไอออนต่างๆ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย , การสะสมแคลเซียมและการสังเคราะห์ NADPH โดย energy-linked transhydrogenase ซึ่งเรียกว่า transhydrogenation เป็นต้น (รูปที่ 8) (hanstein,1976 ; Danishefsky,1980 ; Lehninger et al., 2000)



รูปที่ 6 แสดงลำดับการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยผ่าน complex ของลูกโซ่การหายใจและการสร้างพลังงานโดย ATPsynthase (F_1F_0 - ATPase) (Lehninger, et al., 2000)

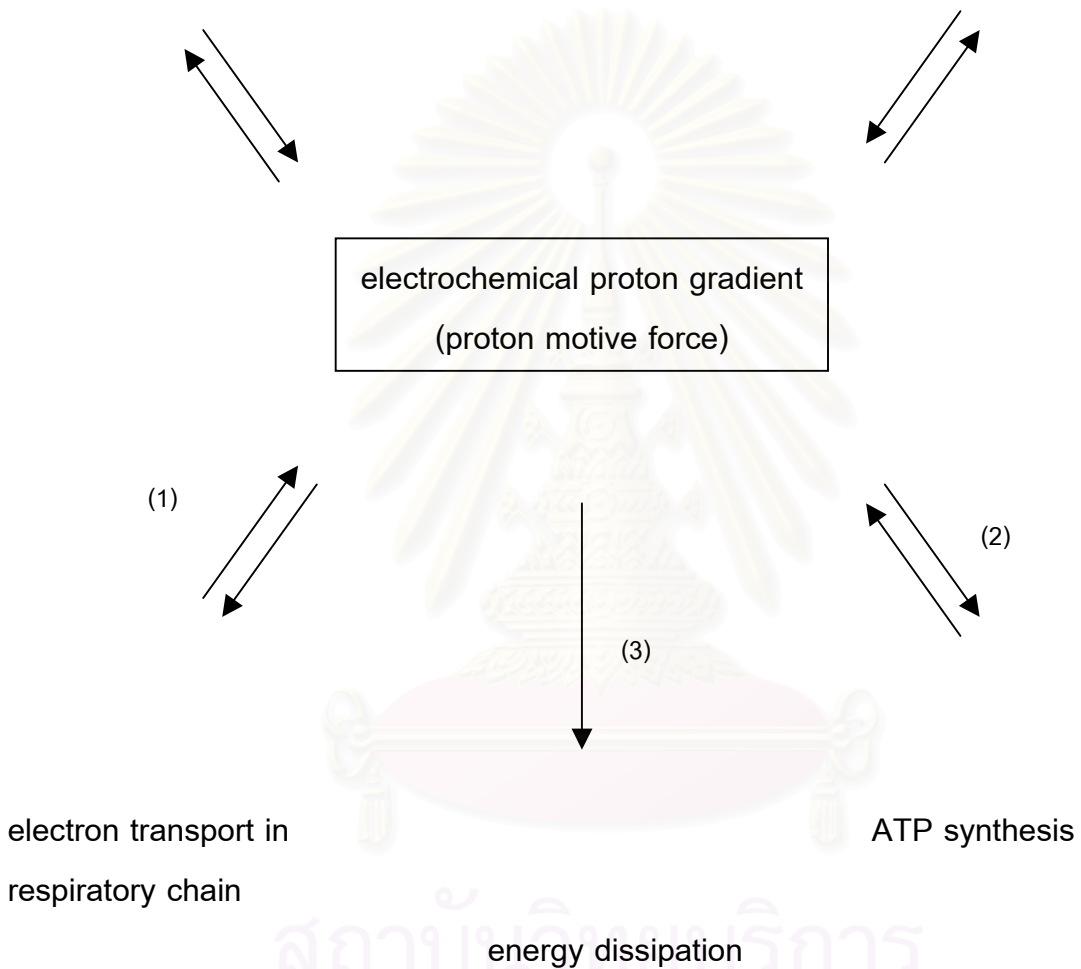


รูปที่ 7 ภาพแสดงการสร้างพลังงานที่ได้จากระบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งเกิดควบคู่กับการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่อธิบายโดย Chemiosmotic coupling hypothesis (Harper et al., 2000)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

calcium transport

energy-linked transhydrogenase

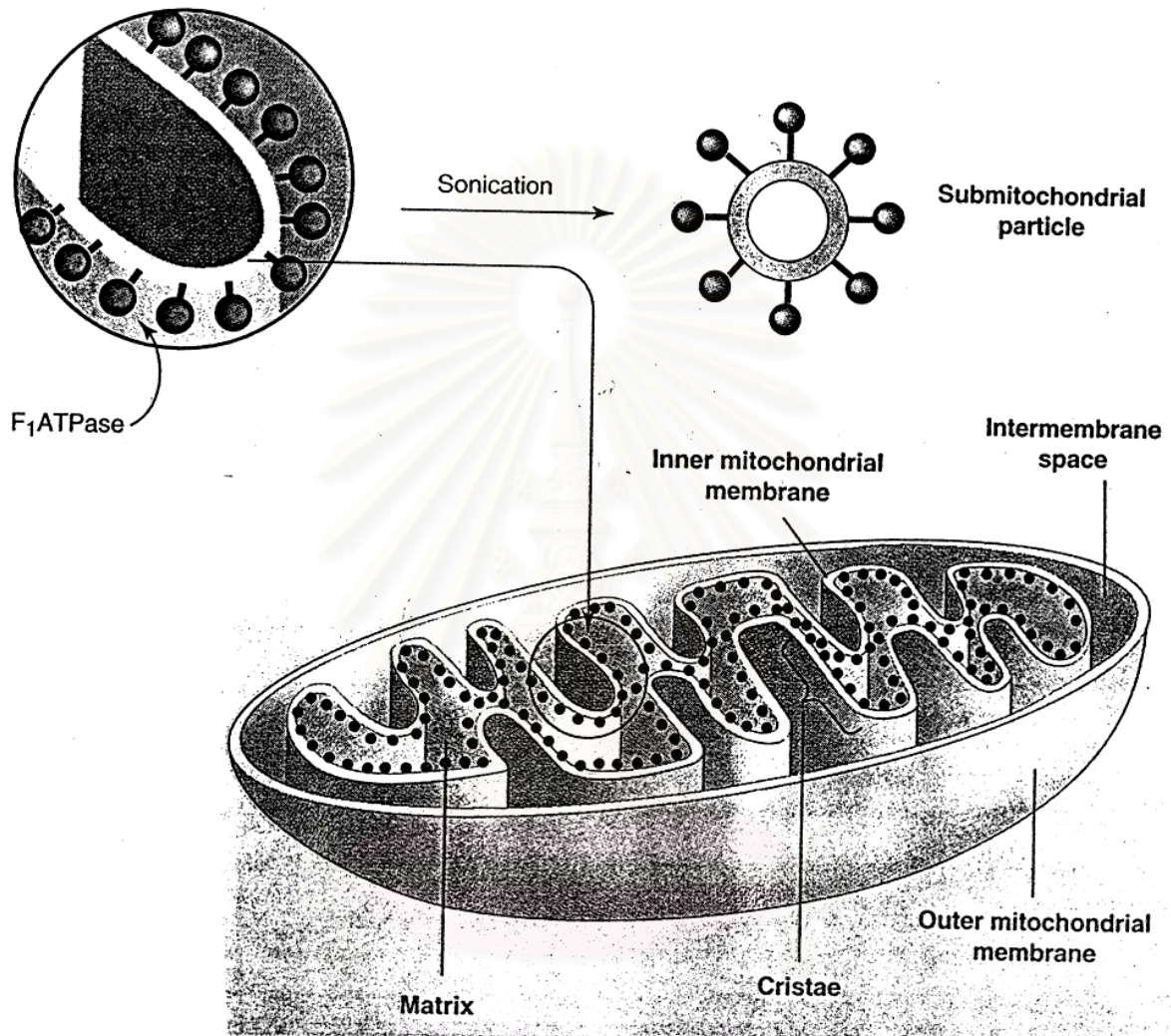


รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโทคอนเดรียสามารถสงวนไว้ (high energy electrochemical proton gradient) และตำแหน่งต่างๆที่ตัวยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียไปออกฤทธิ์ (hanstein,1976)

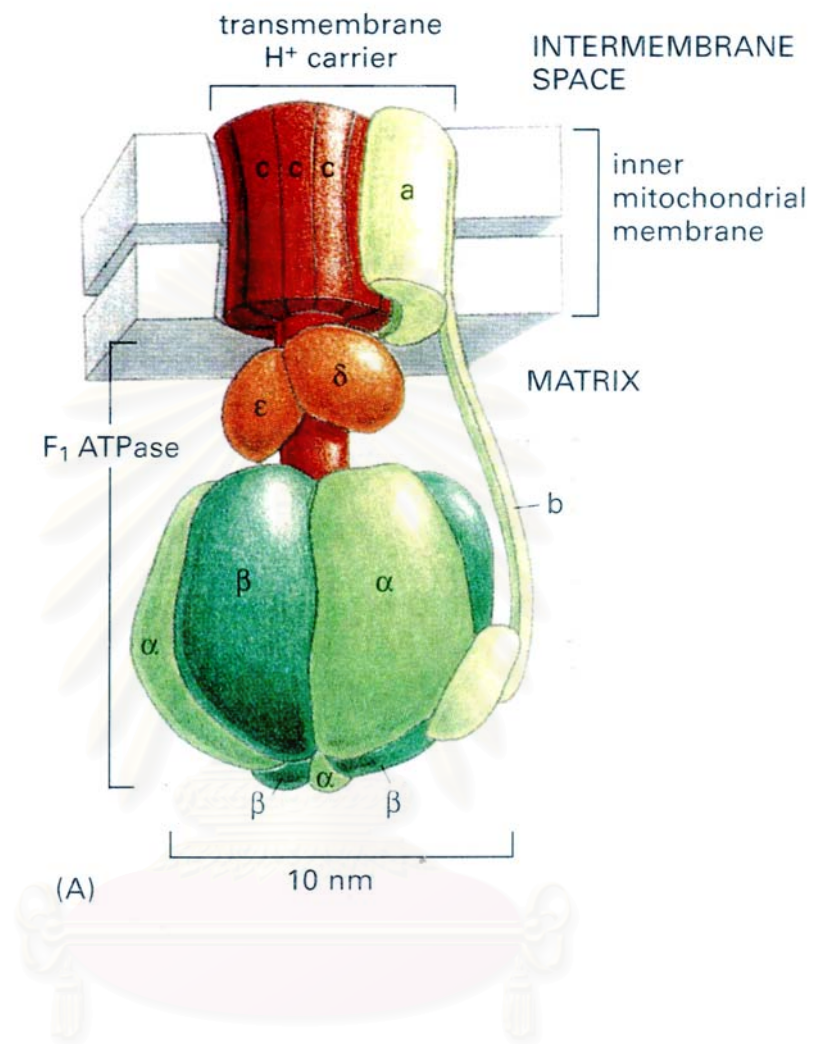
- (1) สารที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านในลูกโซ่การหายใจ
- (2) สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการสร้าง ATP จาก ADP + Pi เช่น oligomycin ,DTNB เป็นต้น
- (3) สารที่มีฤทธิ์ uncoupling เช่น DNP,FCCP เป็นต้น

การสังเคราะห์ ATP โดยไมโทคอนเดรีย

การสังเคราะห์ ATP โดยไมโทคอนเดรีย จะอาศัยเอนไซม์ ATP synthase หรือ F_0F_1 -ATPase ซึ่งจัดว่าเป็น complex V ของลูกโซ่การหายใจ โครงสร้างของเอนไซม์ดังกล่าวจะประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดย่อยรวมกัน (multisubunit protein) มีน้ำหนักโดยรวมมากกว่า 500,000 daltons โดยประกอบด้วย head protein ซึ่งเป็นส่วนหัวของเอนไซม์ ซึ่งมีลักษณะคล้าย lollipop เรียกว่า F_1 domain (F_1 ATPase) ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนจำนวน 6 subunits ประกอบด้วย $3\alpha, 3\beta$ และยังมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบย่อยอีก 3 ชนิดคือ γ, δ และ ϵ ยื่นจากผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียไปยัง matrix และส่วน F_0 domain ซึ่งเป็น (transmembrane H^+ carrier) ประกอบด้วยวงแหวนโปรตีน 10-14 subunits ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถหมุนได้ (rotor) จึงเรียกได้อีกอย่างว่า rotor ring ที่ F_1 domain จะมีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นแขนยื่นยาวออกมา (elongated arm) ไปสัมผัสกับส่วน F_0 domain ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า stator ขณะที่ H^+ เคลื่อนที่ผ่านช่องที่เกิดขึ้นระหว่างรอยสัมผัสของ rotor และ stator ทำให้เกิดการหมุนของ rotor ring ซึ่งการหมุนนี้จะทำให้เกิดการหมุนของ rotating stalk อย่างรวดเร็วภายใน lollipop head ผลที่เกิดขึ้นคือ เกิดการเปลี่ยนรูปของพลังงานที่เกิดจาก proton motive force เปลี่ยนไปเป็นพลังงานกล (mechanical energy) แล้วเปลี่ยนรูปอีกครั้งไปเป็นพลังงานเคมีโดยอาศัย head protein ซึ่งจะมี binding site สำหรับ ADP และ P_i เป็นตัวช่วยผลักดันให้เกิดการสร้าง ATP ซึ่งกระบวนการดังกล่าว เอนไซม์ ATP synthase สามารถสร้าง ATP ได้มากกว่า 100 โมเลกุลต่อวินาทีโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของ H^+ ผ่านประมาณ 3 - 4 โปรตรอนต่อการสร้าง ATP 1 โมเลกุล (รูปที่ 9,10) (Abrahams et al., 1994 ; Boyer, 1997 ; Lehninger et al., 2000 ; Alberts et al., 2002 ; Garrett and Grisham, 2002 ; Karp, 2002)



รูปที่ 9 ภาพแสดงโครงสร้างระดับ submitochondria compartment และโครงสร้าง ATPsynthase (F_1F_0 - ATPase) (Devin, 1997)



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ ATPsynthase ซึ่งประกอบด้วย F₁ ATPase (F₁ domain) transmembrane H⁺ carrier (F₀ domain) , stator (b) (Alberts et al., 2000)

การเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย

จากความสำคัญของไมโทคอนเดรียซึ่งทำหน้าที่สร้างพลังงานให้กับเซลล์ ดังนั้นสารใดก็ตามที่รบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรียก็จะมีผลต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์ได้

จากคุณสมบัติของผนังด้านในของไมโทคอนเดรียซึ่งจะจำเพาะต่อสารที่ผ่านเข้าออกโดยจะไม่ปล่อยให้ H^+ หรืออิออนรวมทั้งสารเมตาโบไลต์ต่างๆผ่านได้อย่างอิสระแต่จะต้องอาศัยตัวพาเฉพาะ (specific membrane protein carrier) ดังนั้นจากคุณสมบัติของตัวพาเฉพาะและการมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านของผนังด้านในจึงมีความสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นผนังเมมเบรนด้านในจึงเป็นเป้าหมายของการเกิดพิษต่อไมโทคอนเดรียซึ่งสารเคมีหรือสารพิษสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียอาจโดยการเพิ่มความสามารถในการผ่านเข้าออก (permeability) ของผนังเมมเบรนด้านใน หรือ โดยการยับยั้งการขนส่งของตัวพาเฉพาะก็ได้ อย่างไรก็ตามการเกิดพิษส่วนใหญ่จะเกิดโดยการเปลี่ยนคุณสมบัติของการเป็นเยื่อเลือกผ่านของไมโทคอนเดรียซึ่งจะมีผลทำให้พลังงานที่ไมโทคอนเดรียสงวนไว้ในรูปของ $6\mu H^+$ ถูกนำมาใช้ในการสร้างและปล่อยออกมาในรูปของพลังงานความร้อน ดังนั้นไมโทคอนเดรียจึงสูญเสียพลังงานที่ได้จากการเมตาโบไลต์สาร (Wallace and Starkov, 2000)

นอกจากสารพิษต่างๆจะก่อให้เกิดพิษในลักษณะที่กล่าวมาแล้ว ยังมีสารอีกหลายประเภทที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียด้วยเช่นกัน(รูปที่ 11) ซึ่งสามารถแบ่งสารที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย ได้เป็น 3 ประเภทใหญ่คือ

1. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Electron transport inhibitors) (Wallace and Starkov, 2000 ; Hodgson and Smart, 2001)

1.1 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex I

(Mitochondrial NADH : ubiquinone oxidoreductase) คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q (site I) complex I จัดเป็นส่วนแรกของ mitochondrial respiratory chain เป็นเอนไซม์ที่อ่อนแอที่สุดของ respiratory chain complex ที่จะถูกทำให้เสียหายที่โดยสารเคมี มีสารเคมีมากกว่า 60 ชนิดซึ่งเป็นทั้งสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่ยับยั้งการทำงานของ complex I ตัวอย่างของสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex I เช่น rotenone, rhein แม้ว่า complex I จะมีอยู่ในไมโทคอนเดรียและ eukaryotic organisms ต่างๆ ก็ตามแต่โครงสร้างของเอนไซม์และความไวต่อสารที่ยับยั้ง (inhibitor) ก็ไม่เหมือนกันในแต่ละ species โดยทั่วไปไมโทคอนเดรียจากแมลงและปลาจะไวต่อการยับยั้งที่ complex I มากที่สุด ในขณะที่ไมโทคอนเดรียจากพืชและรามักจะไม่ค่อยไว ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่าไมโทคอนเดรียจากเซลล์ประสาทไวต่อสารที่ยับยั้งมากที่สุด

1.2 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex III

(bc₁ - complex , ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase) คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c (site II) complex III เป็น complex อันที่ 2 ของ respiratory

chain ความไวของ complex III ของสิ่งมีชีวิต species ต่างๆ ต่อสารเคมีจะต่างกัน สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มนี้ได้แก่ myxothiazol (จากเชื้อ myxobacterium *Myxococcus fulvus*) antibiotic antimycin A , funiculosin, zinc ions เป็นต้น

1.3 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex IV

(Cytochrome c oxidase, COX) คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน (site III) ถ้ามีการยับยั้งที่ complex IV แล้ว นอกจากจะไม่สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนได้แล้ว ยังไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้ substrate ใดก็ตาม ตัวอย่างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มนี้ได้แก่ cyanide, azide , sulfide

2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือ การสังเคราะห์ ATP ซึ่งได้แก่

2.1 oligomycin และ dicyclohexycarbodiimide (DCDD) ซึ่งจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ ATP โดยไปยับยั้งที่ F_0 ของเอนไซม์ ATPsynthase ทำให้ไม่สามารถส่งผ่าน H^+ จาก F_0 ไปยัง F_1 ได้ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิด oxidative phosphorylation รวมทั้งการใช้ ออกซิเจน แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้เมื่อไมโตคอนเดรีย อยู่ในสภาวะ uncoupling (Senior, 1973 ; Voet et al., 1999)

2.2 atractyloside จะยับยั้ง adenosine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็น carrier ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ ไมโตคอนเดรีย ทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger et al., 2000)

2.3 DTNB (5,5' -dithio-bis-2-nitrobenzoate) เป็น aromatic disulfide ยับยั้งการส่งผ่าน P_i จากภายนอกเข้าสู่ใน ไมโตคอนเดรีย โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl groups (-SH groups) ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ทำให้ขาด P_i ในการทำปฏิกิริยา (Haugaard et al., 1969)

2.4 N-ethylmaleimide (NEM) หรือ mersalyl จะมีผลยับยั้ง phosphate translocator ซึ่งทำให้ไมโตคอนเดรีย ขาด P_i เข้าสู่ภายใน ดังนั้นจึงมีผลทำให้เกิดการสลาย ATP เพื่อให้ได้ P_i ขึ้นมาแทน จึงมีผลยับยั้งการสร้าง ATP เช่นเดียวกัน (Erecinska and Wilson, 1981)

3. สารจำพวก uncouplers สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น H^+ carrier หรือ proton-ionophores คือสามารถพา H^+ ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้อย่างอิสระจึงทำลาย electrochemical gradient ดังนั้นจึงมีผลทำให้พลังงานไม่เปลี่ยนรูปเป็น ATP โดยไม่มีผลต่อการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ ซึ่งจะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีการสร้าง ATP (Erecinska and Wilson, 1981 ; Wallace and Starkov, 2000)

สามารถแบ่งสารในกลุ่มนี้ตามกลไกในการออกฤทธิ์ได้ดังนี้

3.1 Classical uncouplers สารในกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid กล่าวคือ เป็นสารที่สามารถละลายได้ในไขมัน, สามารถแตกตัวให้ประจุได้ และสามารถที่จะจับและปล่อย H^+ ได้

3.1.1 สารที่มีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid (HA) ผ่านเข้าไปยังชั้นไขมันของผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียแล้วแตกตัวให้ H^+ และ A^- ตัวอย่างสารที่มีกลไกแบบนี้เช่น FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy phenylhydrazone) และ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)

3.1.2 สารที่สามารถผ่านผนังของไมโทคอนเดรียในรูปของ HA_2^- dimer ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถแตกตัวให้ H^+ (HA) และ anionic (A^-) ได้แก่ 2,4-dinitrophenol และสารที่มีหมู่ phenol, สารในกลุ่ม benzimidazoles

3.2 Ionophores คุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้คือ เพิ่มความสามารถในการผ่านเข้าออกของ H^+ และ cation เช่น K^+ ดังนั้นพลังงานที่ได้จาก $6\mu H^+$ จึงถูกนำมาใช้ในการผลักดัน cation เข้าสู่เมตริกซ์แทน

สามารถแบ่งสารในกลุ่มนี้ตามกลไกในการออกฤทธิ์ได้ดังนี้

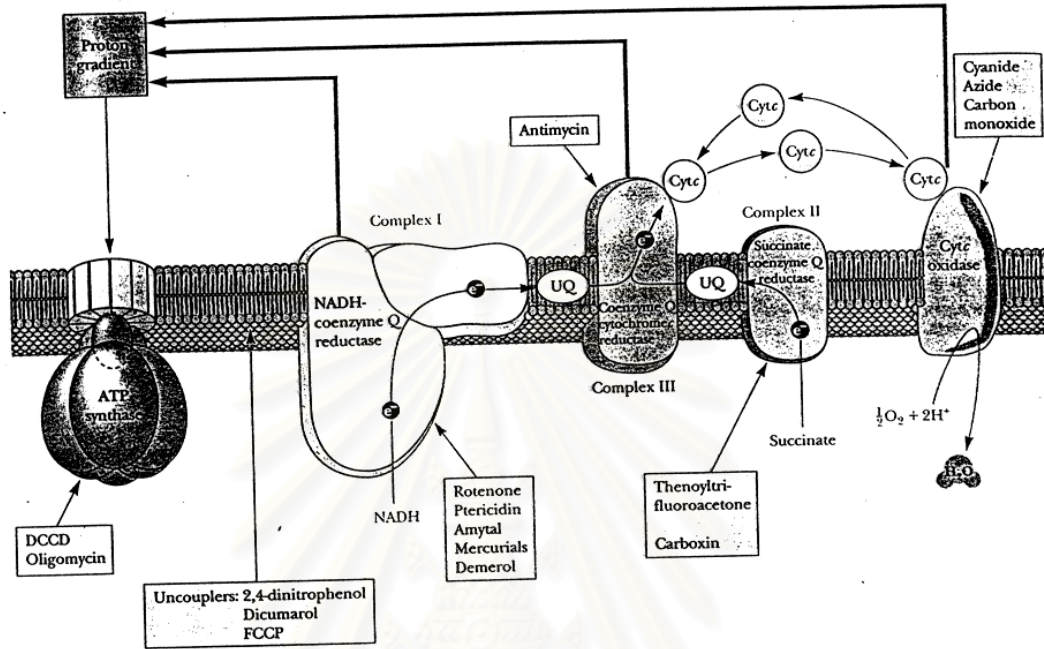
3.2.1 Channel type : โดยการเกิดช่อง (channel) ที่บริเวณชั้นไขมันของผนังไมโทคอนเดรียทำให้ ions เช่น H^+ และ K^+ สามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้ เช่น gramicidins

3.2.2 Carrier type : โดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายในไขมันกับ ion (lipid-soluble complex) เคลื่อนที่ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย เช่น valinomycin, nigericin, calcimycin

3.3 Indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้เกิด uncoupling ได้กลไกต่าง ๆ กัน เช่น picrate และ desaspidin

จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP (F_1 ATPase) แล้วทำให้เกิด uncoupling, Arsenic กับ cadmium จะจับกับ sulhydryl

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงตำแหน่งสารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน
(Garrett and Grisham, 2002)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การขนส่งและการสะสมแคลเซียมโดยไมโทคอนเดรีย

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า ไมโทคอนเดรียสามารถที่จะรับเอาแคลเซียม (uptake หรือ influx) ไปได้ และในทำนองเดียวกันก็ปลดปล่อยแคลเซียม (efflux) ออกได้เช่นกัน ซึ่งอาศัยกลไกที่แตกต่างกัน (Lehninger, 1970)

เมื่อเติมแคลเซียมอิสระ (Ca^{2+}) ลงใน medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่จะพบว่ามีการกระตุ้นการหายใจ พร้อมกับมีการปลดปล่อยโปรตอน (H^+) เข้าสู่ medium พร้อมกับรับเอา Ca^{2+} เข้าไปในไมโทคอนเดรีย การรับเอา Ca^{2+} นั้นเป็น electrogenic process ที่อาศัย membrane potential ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ proton motive force ทั้งหมดที่เกิดขึ้นในขณะที่ยืดเคลื่อนที่ไปตามลูกโซ่การหายใจนั่นเอง (รูปที่ 12)

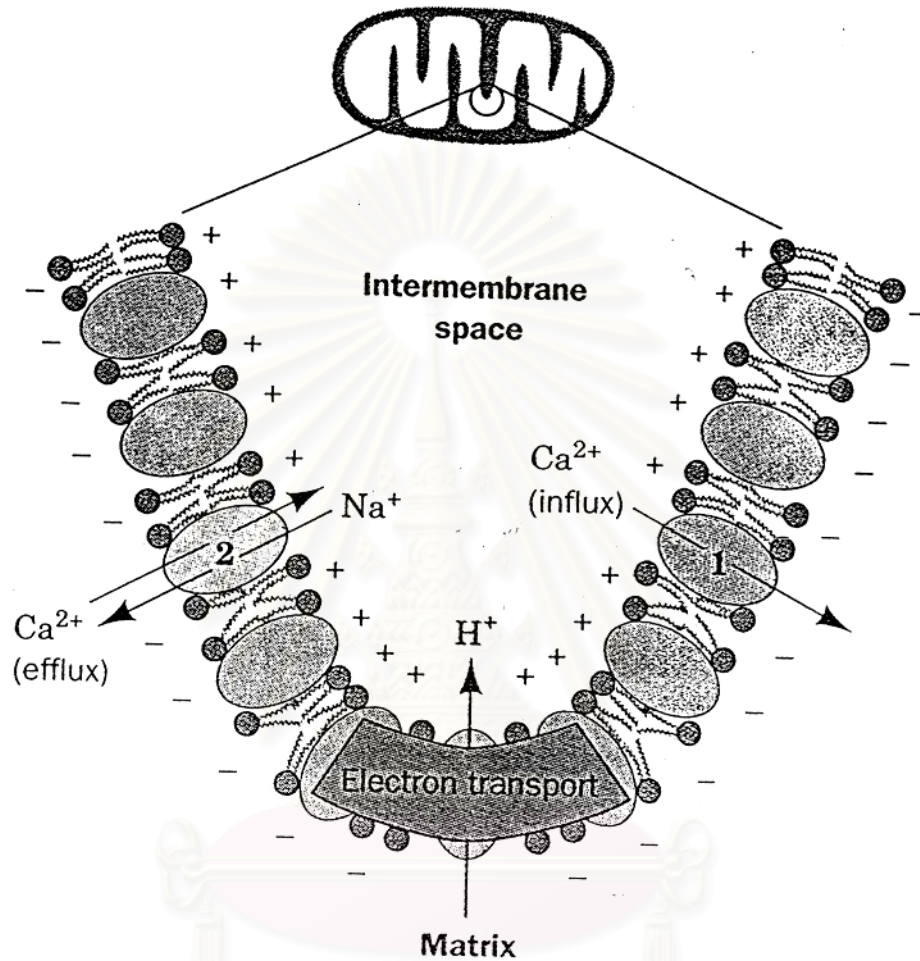
Ca^{2+} จะถูกขนถ่ายพร้อมกับประจุบวก 2 ประจุผ่านทาง uniporter transport system ไมโทคอนเดรีย จะไม่สามารถรับเอา Ca^{2+} ไร้แบบไม่มีซีตจำกัด ดังนั้นจะต้องมีการปลดปล่อย Ca^{2+} ออกไปในอัตราเร็วที่สอดคล้องกับที่รับเข้า การรับเอา Ca^{2+} จะเป็นระบบชนิด one way system และการปลดปล่อย ก็จะเป็นอีกระบบหนึ่งที่แยกจากกันที่ทำงานโดยไม่ต้องอาศัย membrane potential แต่ทั้งระบบที่ใช้ทั้งการรับเอาและปลดปล่อย Ca^{2+} ก็จะมีผลต่อ Ca^{2+} ในลักษณะวงจรหมุนเวียนแคลเซียม (cycling of Ca^{2+}) ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย

การปลดปล่อย Ca^{2+} ออกจากไมโทคอนเดรียมีได้หลายวิธี (รูปที่ 13)

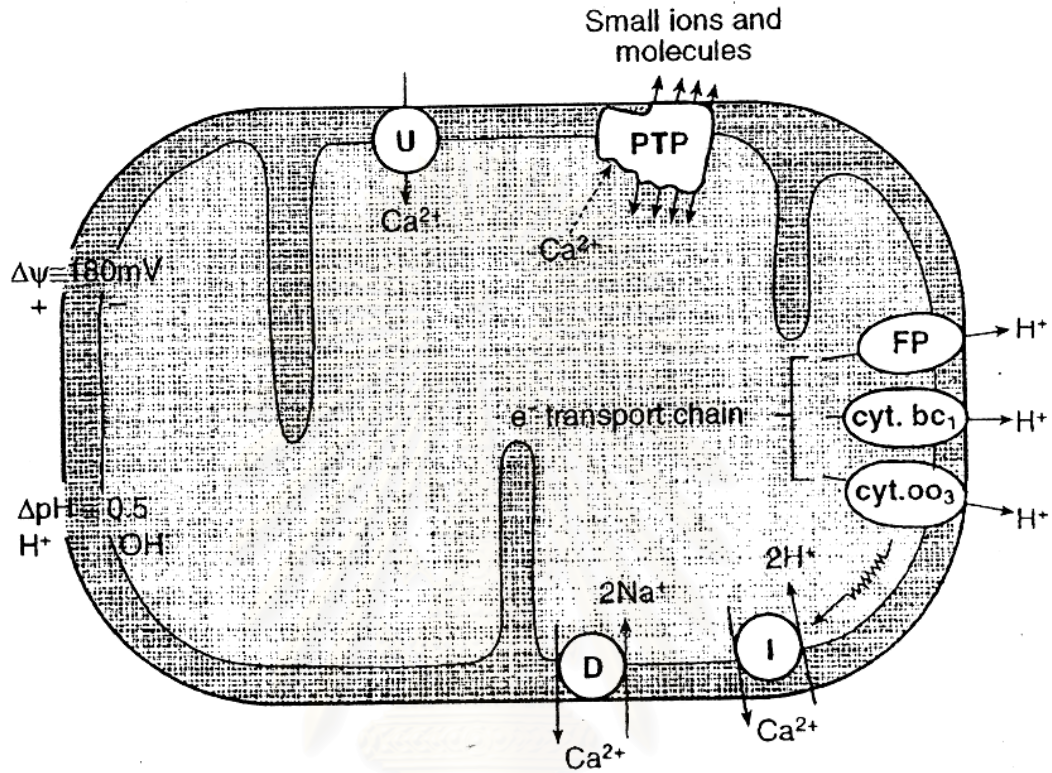
1. non specific leakage ผ่าน pore ที่ inner membrane
2. การเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบของ lipid phase ของ membrane
3. การย้อนกลับ (reverse) ของ uniport influx carrier
4. specific $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$ (หรือ Na^+) antiport system
5. channel mediated release pathways

ที่กล่าวมาแล้วในตอนต้นนั้นเป็นการรับเอาและปลดปล่อยได้ตามสภาพปกติ การปลดปล่อย Ca^{2+} อาจเกิดขึ้นได้อีกตามเงื่อนไขอื่นๆ อีก เช่น การออกซิเดชันของ internal NAD หรือออกซิเดชันของ membrane protein ที่มีส่วนร่วมในการควบคุม Ca^{2+}

การรบกวนสมดุลของ Ca^{2+} (Ca^{2+} homeostasis) มีผลให้เกิดภาวะ Ca^{2+} มากเกิน (Ca^{2+} - overload) เช่น ในกรณี ischaemia และ reperfusion ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญทางพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้น ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเมื่อเกิด ischaemia ขึ้นจะพบว่าเกิดความเสียหายที่ไมโทคอนเดรียในช่วงต้นๆของพยาธิสภาพ ซึ่งจะพบว่าการบวมของไมโทคอนเดรียและการลดลงของอัตราการหายใจทั้งนี้เกิดจากมีปริมาณของ Ca^{2+} ในไมโทคอนเดรียมากขึ้นซึ่งสามารถป้องกันได้ด้วยวิธีการให้ Ca^{2+} -channel blockers เช่น nifedipine, verapamil หรือ diltiazem ก่อนทำให้ผลเสียของภาวะ ischaemia และ reperfusion ในหัวใจที่แยกออกมาจากหนูและกระต่าย ลดลง (Chakraborti et al., 1999)



รูปที่ 12 แสดงการขนส่งแคลเซียม (Ca^{2+}) ในไมโทคอนเดรีย (Voet, Voet, and Pratt, 1999)



รูปที่ 13 แสดงการขนส่งแคลเซียม (Ca^{2+}) โดยไมโทคอนเดรีย

โดยการรับเอา Ca^{2+} โดย uniporter system (U) และการปลดปล่อย Ca^{2+} โดย specific $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter system (I), specific $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ antiporter system (D) และโดยอาศัย permeability transition pore (PTP) (Chakraborti et al., 1999)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑล สาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี

ในการเตรียมสารเคมีจะใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง หรือ ultrapure water ส่วนสารเคมีที่ละลายได้น้อยหรือไม่ละลายในน้ำ จะใช้ absolute ethanol หรือ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายแทน ตัวอย่างสารที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้จะใช้ DMSO ในการเป็นตัวทำละลาย ในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการจะใช้สารละลายของ KOH และ HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.1 แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

สารตัวอย่าง

สารสังเคราะห์อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีน ได้แก่ CU18-11, CU18-12

สารสังเคราะห์อนุพันธ์เอซิลอะนีน ได้แก่ CU18-07, CU18-08, CU18-09, CU18-10, CU18-13

ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช ภาควิชา เกสซ์เคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

สารเคมีจากบริษัท Sigma chemical คือ

ADP, ATP, ammonium molybdate, copper sulfate (CuSO_4), DMSO, DNP, EGTA, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, L-glutamic acid, malic acid, HEPES, dipotassium hydrogen phosphate, magnesium chloride, potassium chloride, potassium dihydrogen phosphate, rotenone, sodium hydroxide, sodium sulfite, sodium bisulfite, succinic acid, sucrose, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, trichloro acetic acid

สารเคมีจากบริษัท E. Merck, Darmstadt คือ

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

2.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) ได้แก่

1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) ปริมาณ 10 μ l, 1M succinate (pH7.2) ปริมาณ 10 μ l, 0.31 M ADP + 0.62 M Pi ปริมาณ 2 μ l, 0.05 M DNP ปริมาณ 2-4 μ l, 0.1 M ATP (pH 7.2) ปริมาณ 150 μ l, bovine serum albumin (BSA) 250 mg/ml, 1 mM EGTA (pH 7.2), 0.25 M sucrose, 1 M HEPES buffer,

1 M MgCl₂, 2.3 M KCl, 0.025 M และ 0.05 M potassium phosphate (KH₂PO₄), 0.2 M H₂SO₄ ปริมาณ 5 ml, 2.5 x 10⁻⁶ M rotenone ปริมาณ 10 μ l, 0.4 M CaCl₂ ปริมาณ 10 μ l, 15 μ M CdCl₂ ปริมาณ 10 μ l, 15 % w/v trichloroacetic acid

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้ของสารเคมีที่ละลายใน DMSO ได้แก่

CU -18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13

ในความเข้มข้น 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ M

3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. Heidolph Motor Drive Homogenizer type 50203 RZR 2
2. pH-meter
3. Hitachi Refrigerated High Speed Centrifuge Model
4. Oxygraph
 - Gilson 's Recorder
 - YSI Model 53 Oxygen Monitor
 - Gilson 's Oxygen chamber
 - Clark 's Oxygen Electrode
5. UV / Visible spectrophotometer 4050 (LKB Ultrospec II)
6. Temperature Controlled Circulator Water bath
7. Thomas Glass homogenizer with teflon pestle

4. การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธี Differential centrifugation ตามวิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myers และ Slater (1957) เป็นผู้ดัดแปลงวิธีเล็กน้อย การเตรียมและปฏิบัติการนั้นตับและไมโทคอนเดรียควรจะแช่อยู่ใน medium ที่เย็นจัด ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice cold) การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจากตับหนูขาวโดย refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเตรียม mitochondria แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยก mitochondria จาก liver homogenate

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

ทำหนูให้ตายทันที โดยวิธี cervical dislocation ทำการผ่าตัดหน้าท้อง ตัดตับออกมาอย่างรวดเร็ว แล้วล้างทันทีด้วยสารละลาย homogenizing medium ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) ที่เย็นจัด นำมาล้างหลายๆ ครั้ง จนดับมีสีซีดจาง แช่ตับใน homogenizing medium โดยให้มีปริมาตรประมาณ 60-70 ml ใช้กรรไกรตัดตับเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างเลือดอีกครั้งโดยใช้สารละลายเดิม เทใส่หลอด homogenize ที่เย็นจัด โดยหลอดที่บรรจุตับจะต้องอยู่ในภาชนะแช่แข็ง (ice cold) นำไป homogenize ด้วย Heidolph Motor Drive Homogenizer Type 50203 RZR 2 จนกระทั่งได้ liver homogenate โดยมีปริมาณ 60-80 ml นำมาเทใส่หลอด centrifuge

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่ได้นำมาปั่นแยก (centrifuge) เพื่อให้ได้ไมโทคอนเดรียโดยใช้ Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge Himac model CR 20B 3 โดยใช้ rotor model RPR 18-3 โดยทำการปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง โดย

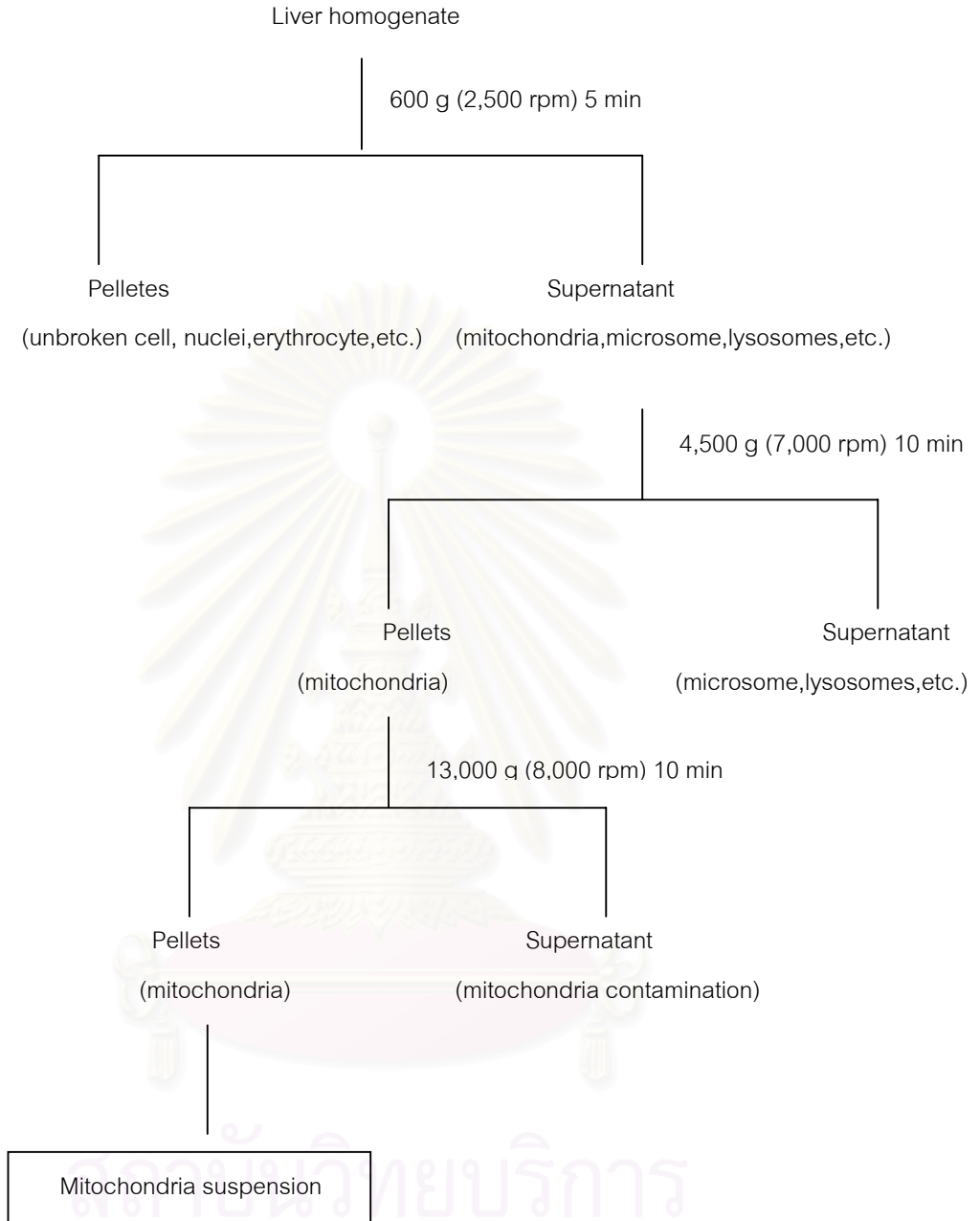
ครั้งที่ 1 นำ liver homogenate มาปั่นที่ 600 x g (2500 rpm) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็น supernatant ใส่ในหลอด centrifuge สำหรับส่วนที่เป็น pellet ให้ทิ้งไป

หมายเหตุ : ส่วนที่เป็น supernatant ที่ได้คือ mitochondria, microsome

ส่วนที่เป็น pellet จะประกอบด้วย nuclei, red blood cell, cell wall, unruptured cell

ครั้งที่ 2 นำส่วนที่เป็น supernatant มาปั่นต่อที่ 4500 x g (7000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้แยก supernatant ทิ้งไปเอาเฉพาะส่วน pellet มา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ที่แช่เย็น ทำ homogenize ด้วยมือโดยใช้ glass homogenizer เพื่อให้ตะกอนกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน

ครั้งที่ 3 นำมาปั่นต่อที่ 13000 x g (8000 rpm) นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้รินส่วน supernatant ทิ้งไป ส่วน pellet นั้นจะมีลักษณะเป็นชั้นของไมโครโซมสีชมพูอยู่ชั้นบนให้กำจัดออกโดยใช้ 0.25 M sucrose ใส่ลงไปเล็กน้อยแล้วค่อยๆ เทออกด้วยความระมัดระวังทำซ้ำจนชั้นของไมโครโซมเหลือน้อยที่สุดจากนั้นก็ทำการ resuspend ตะกอนไมโทคอนเดรียด้วย 0.25 M sucrose แช่เย็นในภาชนะแช่แข็งเพื่อใช้ศึกษาต่อไป



รูปที่ 14 แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้ differential centrifuge (Hogeboom, 1955 ; Myers and Slater, 1957 ; Sordahl, 1971)

5. การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

incubation medium ที่ใช้ในการทำวิจัยแบ่งตามสภาวะการทดลองได้ดังนี้

1. Incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับศึกษาอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ประกอบด้วย

HEPES buffer, pH 7.2	40	mM	(60 mOsm)
MgCl ₂	2	mM	(6 mOsm)
KCl	92	mM	(184 mOsm)

2. Incubation medium สำหรับการศึกษ้อัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Ca²⁺

(Calcium stimulate respiration) ประกอบด้วย

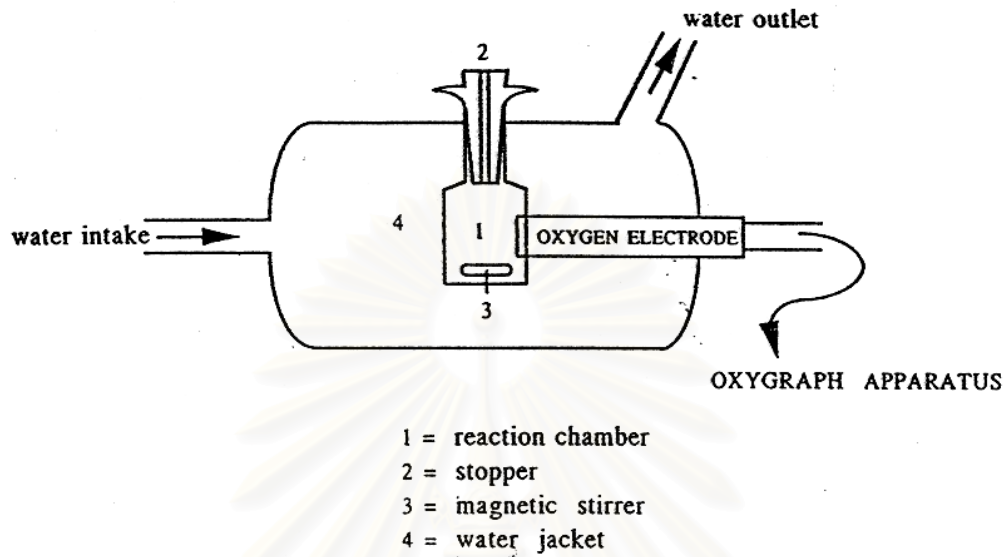
HEPES buffer , pH 7.2	40	mM	(60 mOsm)
MgCl ₂	2	mM	(6 mOsm)
KCL	92	mM	(184 mOsm)
KH ₂ PO ₄	1	mM	

3. Incubation medium สำหรับการศึกษ้อัตราการหายใจ ATPase activity ประกอบด้วย

HEPES buffer , pH 7.2	5	mM	(7.2 mOsm)
MgCl ₂	2	mM	(6 mOsm)
KCL	118	mM	(236 mOsm)

6. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ Gilson's reaction chamber ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2.0 มล. ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น และมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรูๆ สำหรับเติมสารต่างๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรียใน reaction chamber เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลงซึ่งสามารถติดตามดูอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ได้ โดยใช้ Clark's oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับ reaction mixture ใน chamber และสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนใน reaction mixture ที่วัดได้โดย oxygen electrode นี้ จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor ซึ่งจะมีหน้าปัดบอกปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ในขณะนั้นๆ สามารถบันทึกอัตราการลดลงของออกซิเจนใน reaction chamber ด้วย Gilson's recorder บันทึกผลที่ได้ออกมาในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจน (polarographic tracing หรือ oxygraph tracing) นอกจากนี้ในระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่างๆใน reaction chamber นั้น จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา อุณหภูมิใน reaction chamber ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 °C โดยใช้ น้ำที่มาจากเครื่อง water bath ที่กำหนดอุณหภูมิไว้



รูปที่ 15 แสดง Gilson 's Oxygen chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของ
 ไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน
 reaction chamber แล้วอ่านบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus
 (oxygen monitor + recorder)

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรีย(Mitochondria respiratory state)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการทำงานของ mitochondria มีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจน, สับสเตรท ,ADP+Pi หรือการมี uncoupler หรือไม่ เป็นต้น Chance and William (1956) ได้จัดแบ่งภาวะการหายใจของ mitochondria ตามองค์ประกอบสำคัญ เป็นดังนี้

state	condition
1	มีเพียง O ₂
2	มี O ₂ และ ADP
3 (active state)	มี O ₂ , ADP และ substrate
3u	มี uncoupler
4 (resting state)	มี O ₂ และ substrate
5	มีเพียง substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess Ca ²⁺

7.การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index, RCI) และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียระยะต่างๆ

7.1การคำนวณดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index, RCI)

นอกจาก Chance and william จะแบ่งภาวะ (states) การหายใจของไมโทคอนเดรียเป็นภาวะต่างๆ ดังกล่าวมาแล้วยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่(coupling) กันของกระบวนการ oxidation และกระบวนการ phophorylation ค่า RCI นี้บอกถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี คือเป็น intact mitochondria หรือไม่ การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned}
 \text{RCI} &= \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 4}} \\
 &= \frac{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state 3}}{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state 4}}
 \end{aligned}$$

จากตัวอย่าง oxygraph tracing การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน X ของ ทั้งสอง state ยาวเท่ากันดังนี้

$$\text{RCI} = \frac{Y1/X}{Y2/X} = \frac{Y1}{Y2}$$

7.2 การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียระยะต่างๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 15 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้ดังนี้

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ในการทำปฏิกิริยา

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง คือ ถ้ามีปริมาตรของ reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลายอิมตัวอยู่ได้มาก และถ้าอุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิมตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่อมีอุณหภูมิสูง

การคำนวณหาค่า S จะหาได้จากค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน incubation mixture 1 ml (A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา จะได้จำนวนของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน 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 (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 nm แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตรเมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 nm) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37 °C

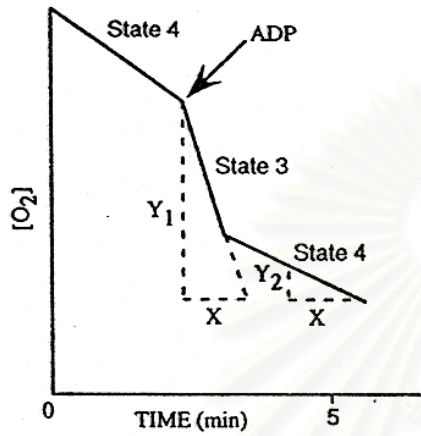
P = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21 %

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

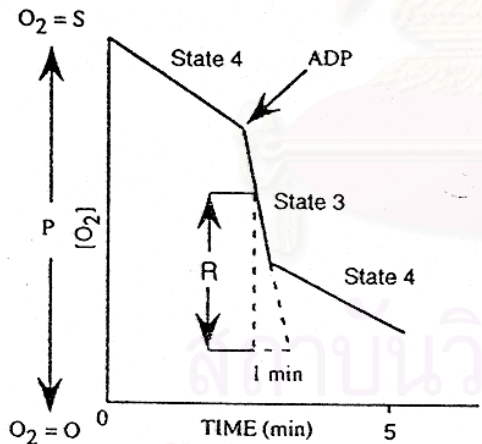
V = ปริมาตรก๊าซที่ 0 °C ความดัน 1 บรรยากาศเทียบกับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 ml

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

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียแล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีหน่วยเป็น n atoms/min/mg protein



รูปที่ 16 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหา RCI



รูปที่ 17 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

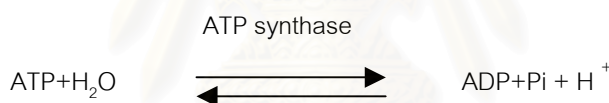
A = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัว อยู่ในน้ำ 1 ml

ค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.2 ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ ที่ 37°C ซึ่งค่า A ในที่นี้ จึงเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ของ oxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

8. การวัด ATPase activity ของ ไมโตคอนเดรีย

การศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรียในการวิจัยครั้งนี้จะทำโดยการวัดปริมาณ P_i ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP ดังสมการ



ดังนั้นการศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรียสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

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

8.2 โดยการวัดปริมาณของ P_i ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีวัดปริมาณ P_i ที่เกิดจากการสลาย ATP โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการ incubate ไมโตคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายต่างๆ ที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ ทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20 % นน./ปริมาตร ของ trichloroacetic acid จำนวน 1 ml อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่แข็งทันที

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ P_i ที่เกิดขึ้น ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนดแล้วนำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (LKB ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเป็น blank แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ P_i จากกราฟมาตรฐานของ P_i ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆ ครอบคลุมค่าของตัวอย่าง

วิธีการวัดเพื่อหา ATPase activity ของไมโทคอนเดรียมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 ml. ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆ ที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37 ° ส่วนล่างของภาชนะทรงสูงจะมี magnetic stirrer คอยปรับหมุนกวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันตลอดเวลา
2. เติม mitochondria suspension 200 μ l
3. เติมสารละลายของสารที่ต้องการศึกษาแล้วรอเวลา 1 นาที (control เติม solvent ที่ใช้ละลายสารที่ต้องการศึกษาในปริมาตรที่เท่ากัน)
4. เติม 0.1 M ATP 150 μ l แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
5. เมื่อครบกำหนดเวลา 10 นาทีแล้วจึงดูด reaction mixture ปริมาณ 1 ml. แล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ที่มี 20 % w/v ของ trichloroacetic acid 1 ml อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที
6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm. นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน
7. ดูดส่วน supernatant 1 ml. (ถ้าเป็น blank ใช้ น้ำกลั่น 1 ml. แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 ml ของ K_2HPO_4 ที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 mM แทน) แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 M H_2SO_4 5 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน
8. เติม 2.5 % w/v ammonium molybdate 0.8 ml
9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 ml เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer (LKB ultrospec II) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample จะนำมาคำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve

หมายเหตุ :

- Fiske Subbarow reducing agent ประกอบด้วย 15 % sodium bisulfite 97.5 ml, 20 % sodium sulfite 2.5 ml และ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม

- ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ที่ละลายไม่หมด ให้กรองออก โดยใช้กระดาษกรองและเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน

10. การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

ปริมาณของไมโทคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondria suspension ที่เตรียมจากตับหนูขาว ใช้วิธีการวัดเป็นปริมาณโปรตีนซึ่งใช้วิธีการหาโดยวิธีของ Lowry (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ $CuSO_4$ ในสารละลายต่างจะเกิดเป็น co-ordinate complex ของ copper กับอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (LKB ultrospec II)

โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ที่ใช้ bovine albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นมาตรฐาน ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เจือจาง mitochondria suspension 10 μ l ด้วยน้ำกลั่น 3 ml. (1: 300) จะได้สารละลาย A
2. ดูดสารละลาย A ปริมาตร 1 ml. ใส่ในหลอดทดลองเดิม alkaline copper reducing agent 1 ml (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำ 1 ml. ส่วนกรณีที่ทำ 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) เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
3. เติม Folin-Phenol reagent (dilution 1: 10) 3 ml เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50 c⁰ เป็นเวลานาน 10 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ในที่เย็นที่อุณหภูมิห้องนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (LKBultrospec II) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียหน่วยเป็น mg/ml

การเตรียมสารละลายที่ใช้

- Alkaline copper reducing agent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5 % CuSO₄ ที่ละลายอยู่ใน 1 % (w/v) ของ potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10 % NaCO₃ ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH
- Foline - phenol reagent (1:10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin-Ciocalteu 's Phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 10(v/v) และเตรียมใช้ทันที

10. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

10.1 การแสดงผลการทดลอง แสดงออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

10.1.1 oxygraph tracing

เป็น oxygraph tracing ที่ได้จากการทดลองซึ่งแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะเวลาต่างๆ มีหน่วยเป็น nano atoms O/ml/min

10.1.2 ตารางและกราฟ

10.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนระยะเวลาต่างๆ แสดงเป็น $\bar{x} \pm S.E$ การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกลุ่มทดลองใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีน ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 18 แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวซึ่งนำมาใช้ในการทดลอง ตัวเลขที่กำกับอยู่ทุกระยะของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state ต่างๆมีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min ส่วนประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยามีไมโตคอนเดรีย incubate อยู่ใน medium ที่มี glutamate + malate เป็นสับสเตรท ปริมาณมากเกินพอ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในระยะแรกมีค่า 13.90 n atoms O/ml/min ระยะนี้เรียกว่า state 4 respiration เมื่อเติม ADP+ Pi ลงไปในปฏิกิริยาจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ขึ้น พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 103.99 n atoms O/ml/min เรียกระยะการหายใจของไมโตคอนเดรียที่มีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจากการเติม ADP + Pi นี้ว่า state 3 respiration ซึ่งเมื่อ ADP ถูกใช้หมดไปอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะลดลงเป็น 15.58 n atoms O/ml/min ซึ่งจะกลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม ค่า RCI ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองตามรูปที่ 1 มีค่าเท่ากับ 6.67 เมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler ลงไป DNP สามารถกระตุ้นการหายใจทำให้ไมโตคอนเดรียเกิดการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันจนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction medium ($O_2 = 0$) เรียกระยะนี้ว่า state 3u respirationซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้จะเพิ่มเป็น 130.69 n atoms O/ml/min

จากรูปที่ 19 แสดงถึงผลของ CU-18-07 ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 3 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท โดยเติม CU-18-07 ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M เป็นเวลา 1 นาทีก่อนเติม 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi พบว่า CU-18-07 สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลงได้เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 4.78 ± 5.02 , 9.17 ± 3.48 , 17.22 ± 6.61 , 20.31 ± 4.37 , 51.70 ± 10.53 ตามลำดับ

สำหรับ CU-18-08 จนถึง CU-18-13 ก็ได้ทำการทดลองอย่างเดียวกันกับ CU-18-07 ได้แสดงผลไว้ในรูปที่ 20-25 และตารางที่ 4

สำหรับ IC₅₀ ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ของสารทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 5

2. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีน ที่มีต่อการออกซิเดชันของ succinate

จากรูปที่ 26 เป็นการศึกษาผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพรีดีนและเอซิลอะนิลีน ต่อการออกซิเดชันของ succinate โดยทำการทดลองสารทดสอบที่ความเข้มข้น 10^{-4} M ซึ่งพบว่าหลังจาก incubate

ไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม succinate แล้ววัดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 มีค่าเท่ากับ 31.98 ± 5.12 n atoms O/ml/min และหลังเติมสารทดสอบ CU-18-07 การใช้ออกซิเจนใน state 4 เพิ่มขึ้นเป็น 38.65 ± 5.30 n atoms O/ml/min สำหรับ CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ทำการทดลองอย่างเดียวกันแสดงผล ดังตารางที่ 6 ซึ่งเมื่อดูจาก tracing พบว่า CU-18-09 และ CU-18-10 เมื่อเติม succinate ลงไปจะมีอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เพิ่มขึ้นอย่างมาก อย่างมีนัยสำคัญ

3. ผลของแคดเมียม (Cd^{2+}) ต่อการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

จากรูปที่ 27 tracing 1 แสดงอัตราการหายใจในสภาวะที่ไม่มีการเติม Cd^{2+} โดยหลังจาก incubate ไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงเติม succinate ลงไป หลังจากนั้น 1 นาที จึงเติม DMSO และ ADP + Pi ตามลำดับ เมื่อวัดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 และ state 3 respiration มีค่าเท่ากับ 31.14 และ 96.40 n atoms/ml/min ตามลำดับ

จาก tracing 2A เป็นการทดสอบผลของ CU--18-07 พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 และ state 3 เมื่อไม่ได้เติม $15 \mu\text{M CdCl}_2$ มีค่าเป็น 53.39 n atoms/ml/min และ 142.37 atoms/ml/min ตามลำดับและ tracing 2B เมื่อเติม $15 \mu\text{M CdCl}_2$ ลงไปในปฏิกิริยาพบว่าจะสามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 และ state 3 respiration ลงเหลือ 8.90 และ 4.45 n atoms/ml/min ตามลำดับ

สำหรับ CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 จะทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน ซึ่งสามารถสรุปผลทั้งหมดได้ดังตารางที่ 7

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการให้อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ร่วมกับ CdCl_2 จะมีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 และ state 3 respiration ลดลง (รูปที่ 27)

4. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนกับ rotenone ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

จากรูปที่ 28 tracing 1 แสดงสภาวะที่ยังไม่ได้มีการเติมสารทดสอบ หลังการ incubate ไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 1 นาที และเติม glutamate+ malate (ซึ่งเป็น NAD^+ -linked substrate ที่ไมโตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์และทำให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้าสู่ site I ของลูกโซ่การหายใจ) พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 10.01 atoms O/min/ml จากนั้นเติม rotenone ลงไป (rotenone เป็นสารยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนใน site I) อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเหลือ 6.67 n atoms O/min/ml และเมื่อเติม ADP ลงไปอัตราการใช้ออกซิเจนจะยังคงไม่เปลี่ยนแปลง หลังจากนั้น 1 นาทีเติม succinate ลงไปใน incubation ซึ่ง succinate จะสามารถส่งอิเล็กตรอนเข้าสู่ ubiquinone โดยตรง (ซึ่งเป็น complex II ของลูกโซ่การหายใจ) พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นสูงเป็น 87.87 n atoms O/min/ml และเมื่อเติม DNP ลงไปอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 98.99 n atoms O/min/ml

สำหรับ tracing 2-8 จะทำการทดลองในลักษณะเดียวกันแต่จะเติมสารทดสอบ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ลงไปใน medium ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงค่อยเติม rotenone ตามลงไป ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 28

5. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP

5.1 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP

จากรูปที่ 29 แสดงให้เห็นผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP ซึ่งเป็น state 3u respiration พบว่า CU-18-09, CU-18-10, CU-18-12 มีผลยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3u หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 77.08, 77.51 และ 62.24 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการเติมและไม่เติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารทดสอบ พบว่าการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u เท่ากับ 62.33 ± 2.31 และ 58.74 ± 8.24 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปผลทั้งหมดได้ดังตารางที่ 8

5.2 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ของ CU-18-09 และ CU-18-10 ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย DNP

จากรูปที่ 30 แสดงให้เห็นผลของ CU-18-09 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP พบว่า CU-18-09 จะลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u จาก 62.35 ± 6.20 เป็น 61.52 ± 9.80 , 47.88 ± 7.08 , 30.53 ± 3.77 , 16.19 ± 1.37 , 6.93 ± 1.33 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นเมื่อคิดเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 1.33, 23.21, 51.03, 74.02, 88.89 ตามลำดับ

จากรูปที่ 31 แสดงให้เห็นผลสำหรับ CU-18-10 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M ต่อ การหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP พบว่า CU-18-10 จะลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ของ ไมโตคอนเดรียจาก 62.35 ± 6.20 เป็น 42.77 ± 9.98 , 31.57 ± 4.85 , 22.22 ± 0.63 , 14.80 ± 2.12 , 6.93 ± 1.33 ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นเมื่อคิดเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 31.39, 51.77, 64.37, 72.26, 88.89 ตามลำดับ

6. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+} (Calcium-stimulated respiration)

จากรูปที่ 32 เปรียบเทียบการเติมและไม่เติม DMSO มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 26.04 ± 0.60 และ 28.56 ± 1.39 n atoms/min/mg protein ซึ่งไม่พบความแตกต่างของอัตราการใช้ออกซิเจนอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการเติม DMSO ไม่มีผลต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย สำหรับผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย Ca^{2+} มีอัตราการใช้ออกซิเจนดังแสดงในตารางที่ 9

ซึ่งพบว่า CU-18-09, CU-18-10 และ CU-18-12 สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย Ca^{2+} ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

7. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

จากรูปที่ 33 แสดงผลของสารทดสอบที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยทำการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายตัวของ ATP เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารทดสอบ พบว่า Pi liberate มีค่าเท่ากับ 0.30 ± 0.05 และ 0.30 ± 0.05 $\mu\text{moles/mg protein/10 min}$ ซึ่งแสดงว่าการเติม DMSO ไม่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

ผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M และ DNP ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้สรุปได้ดังตารางที่ 10 ซึ่งพบว่า มีเพียง CU-18-09, CU-18-10 และ DNP ที่ออกฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หากทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ระหว่าง DNP กับ CU-18-09 และ CU-18-10 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 กราฟแสดง oxygraph tracing การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว
เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

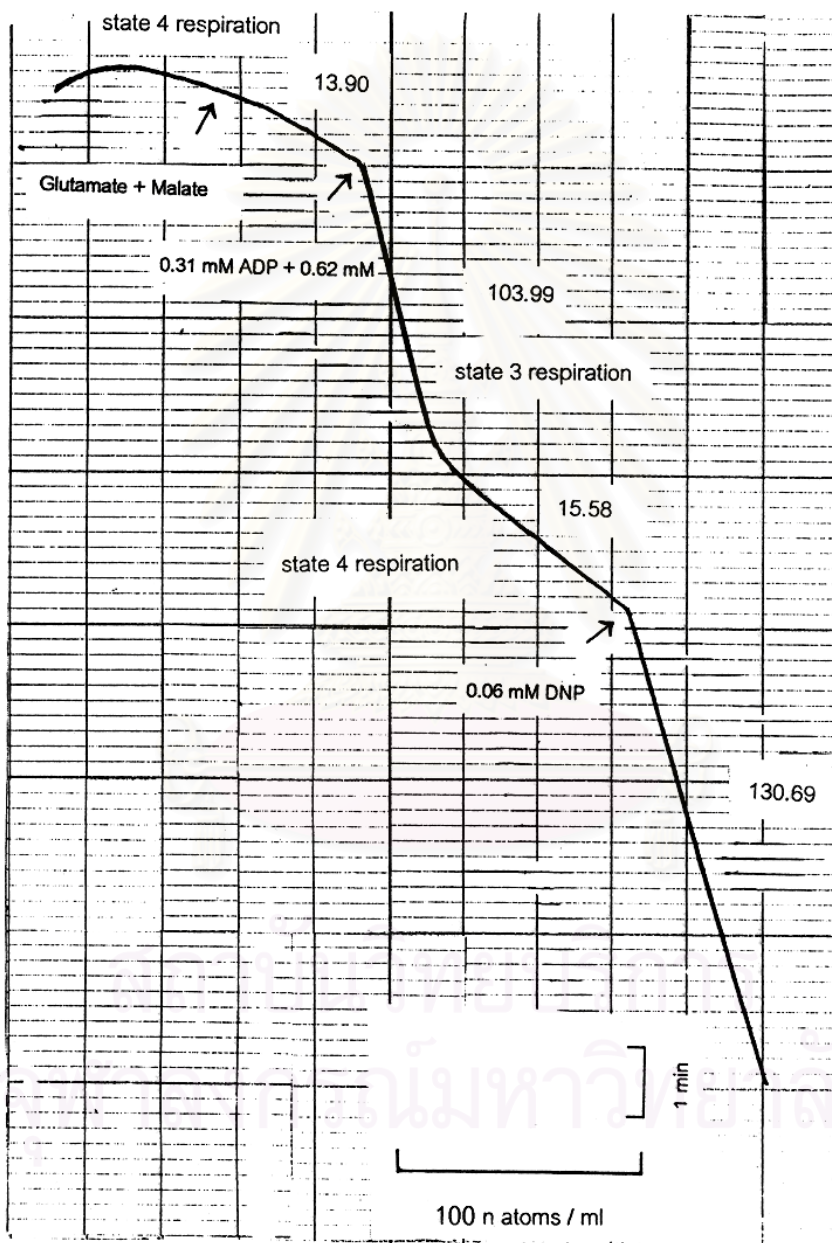
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM
KCL, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi,
0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.26 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92
ml. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมา
หน่วยเป็น n atoms O/ml/min



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 กราฟแสดง oxygraph tracing การใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย



รูปที่ 19-25 แสดง % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรีย โดย CU-18-07, CU-18-08 , CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

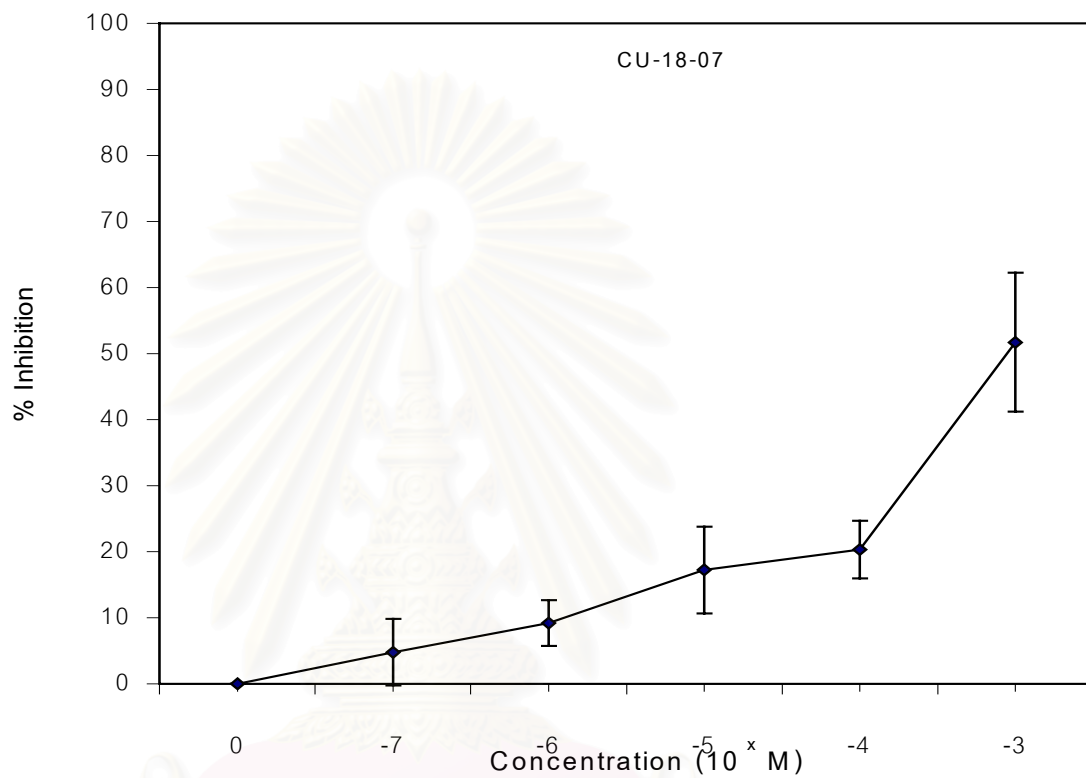
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μ l และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.26 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37^o C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



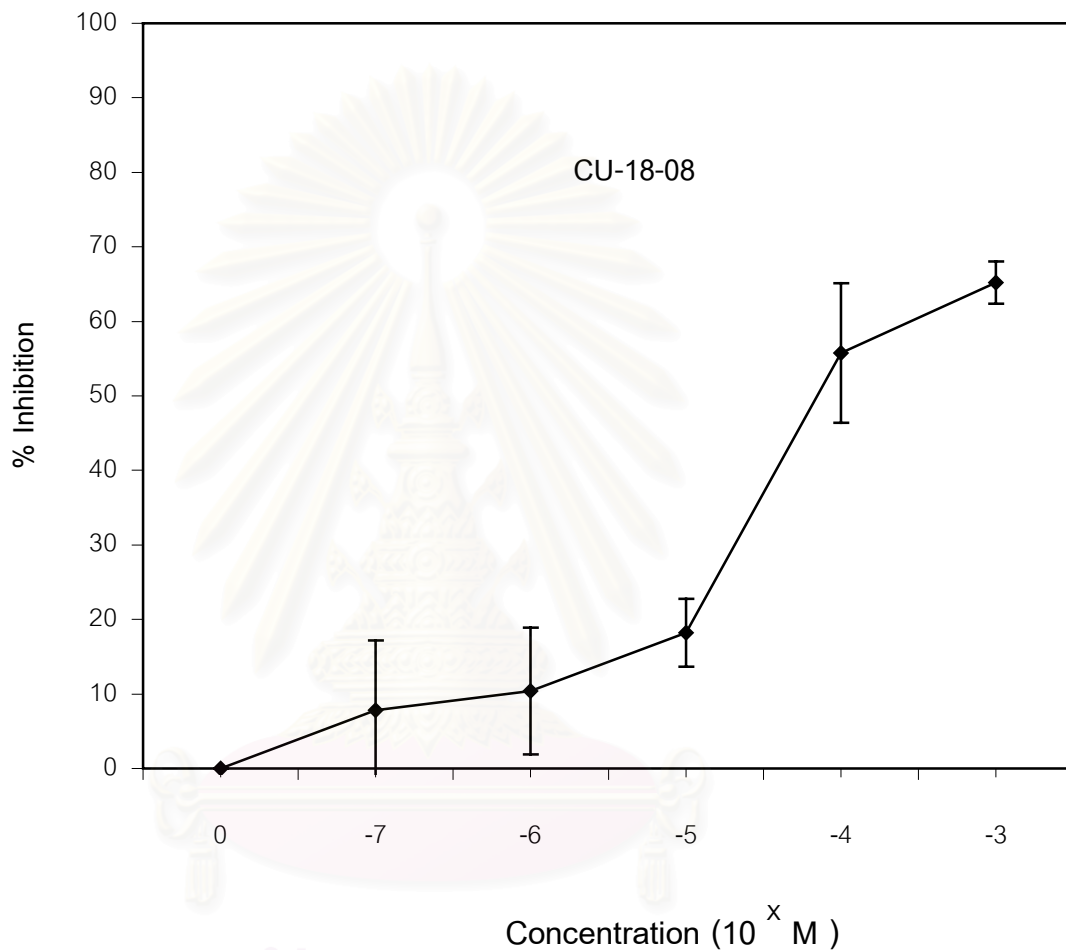
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโทคอนเดรียโดย CU-18-07 ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (n=4)



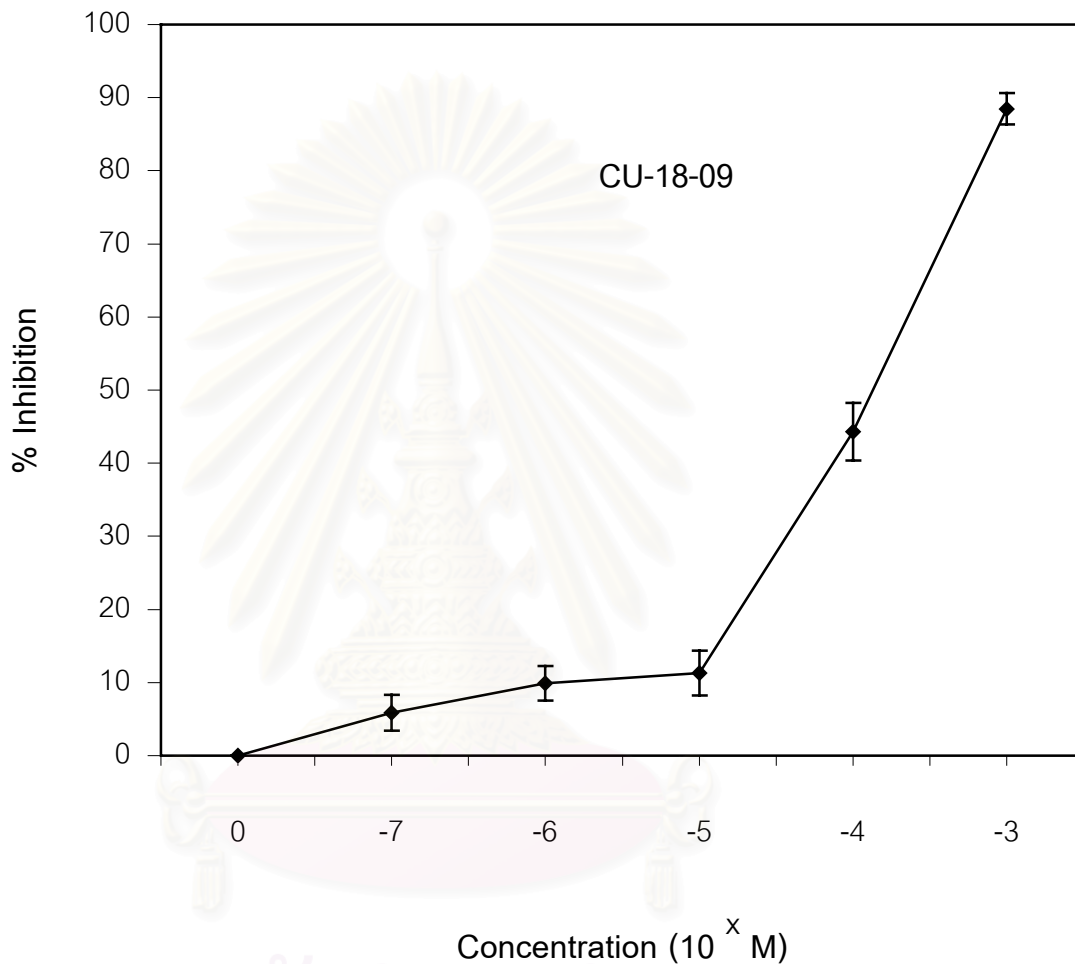
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโทคอนเดรียโดย CU-18-08 ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (n=4)



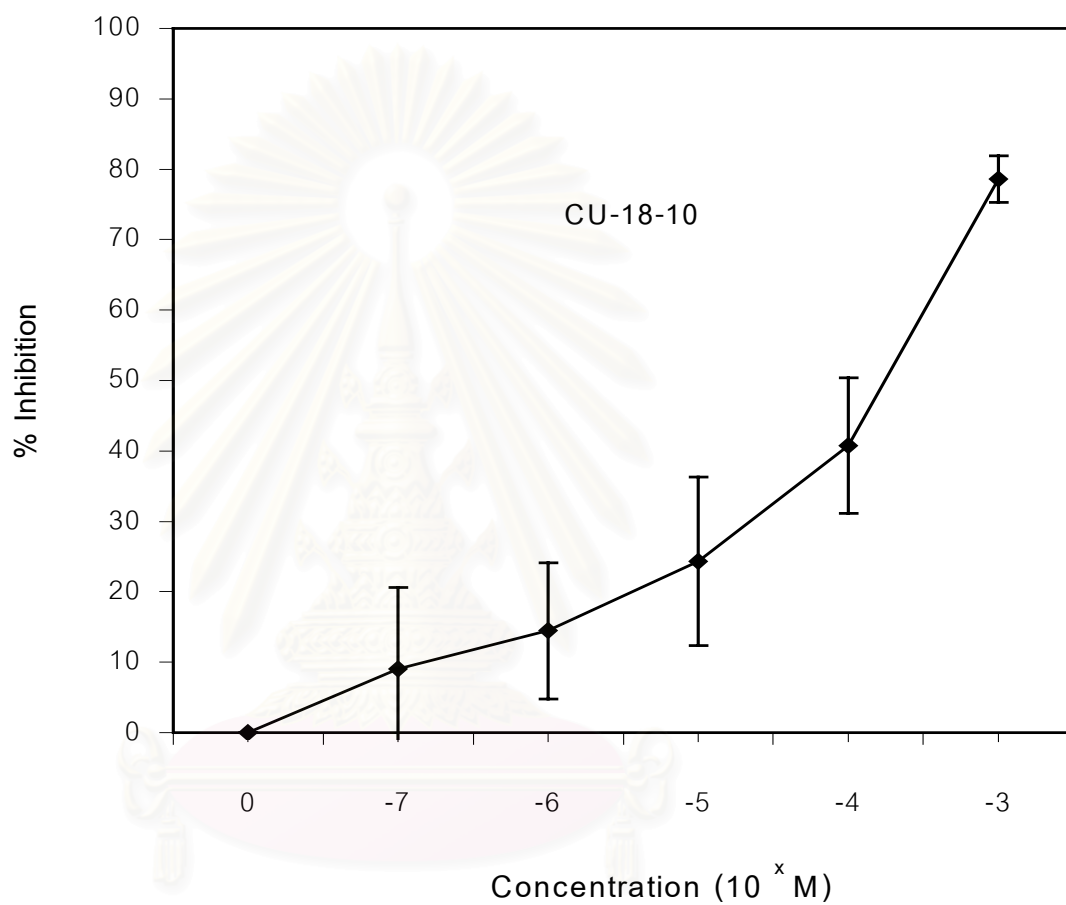
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-09 ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (n=4)



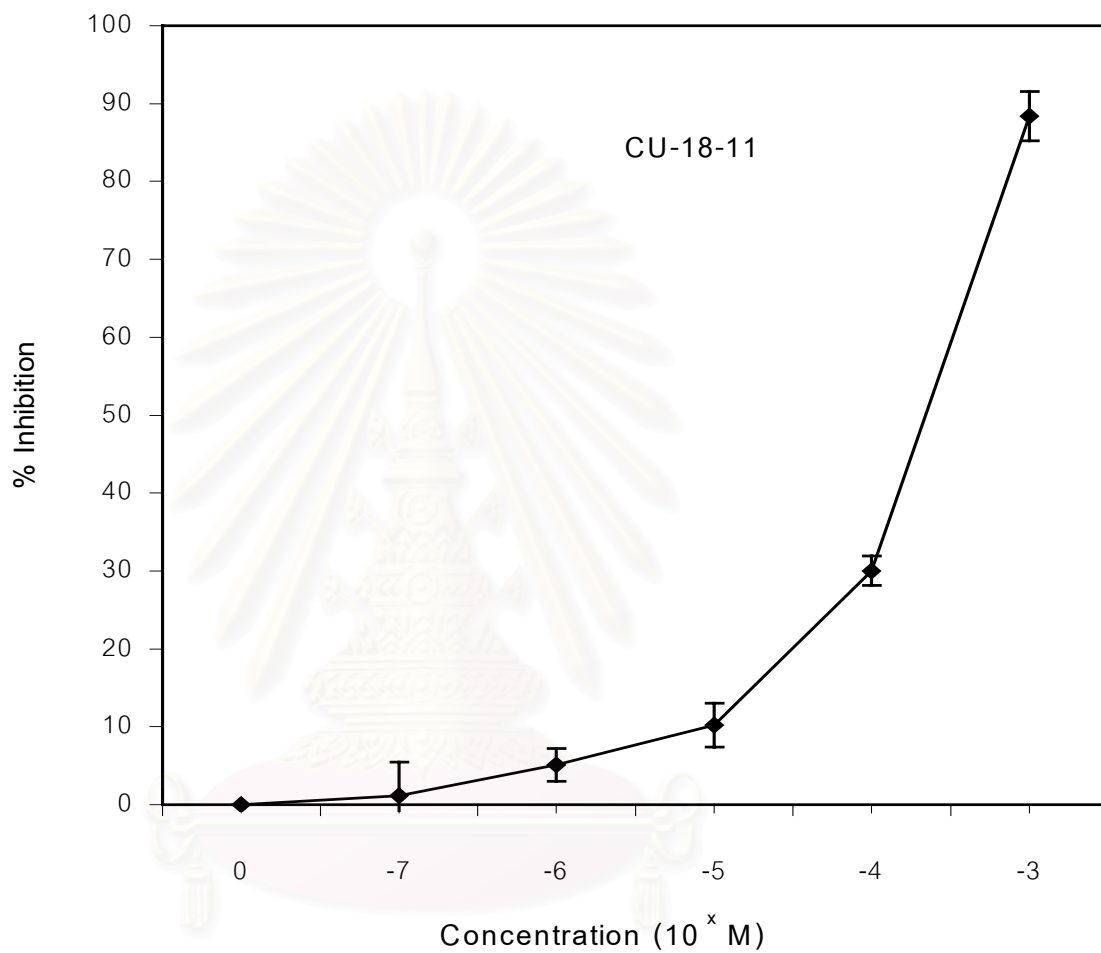
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโทคอนเดรียโดย CU-18-10 ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (n=4)



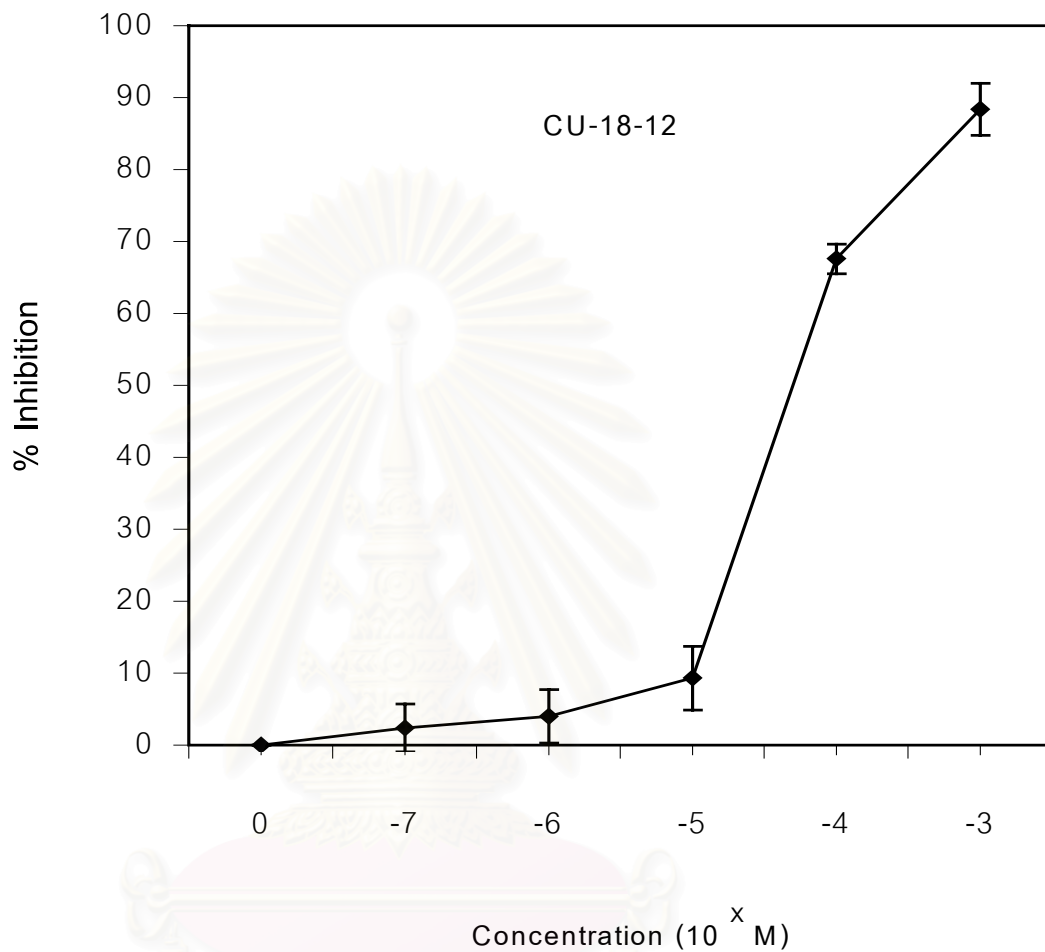
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโทคอนเดรียโดย CU-18-11 ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (n =4)



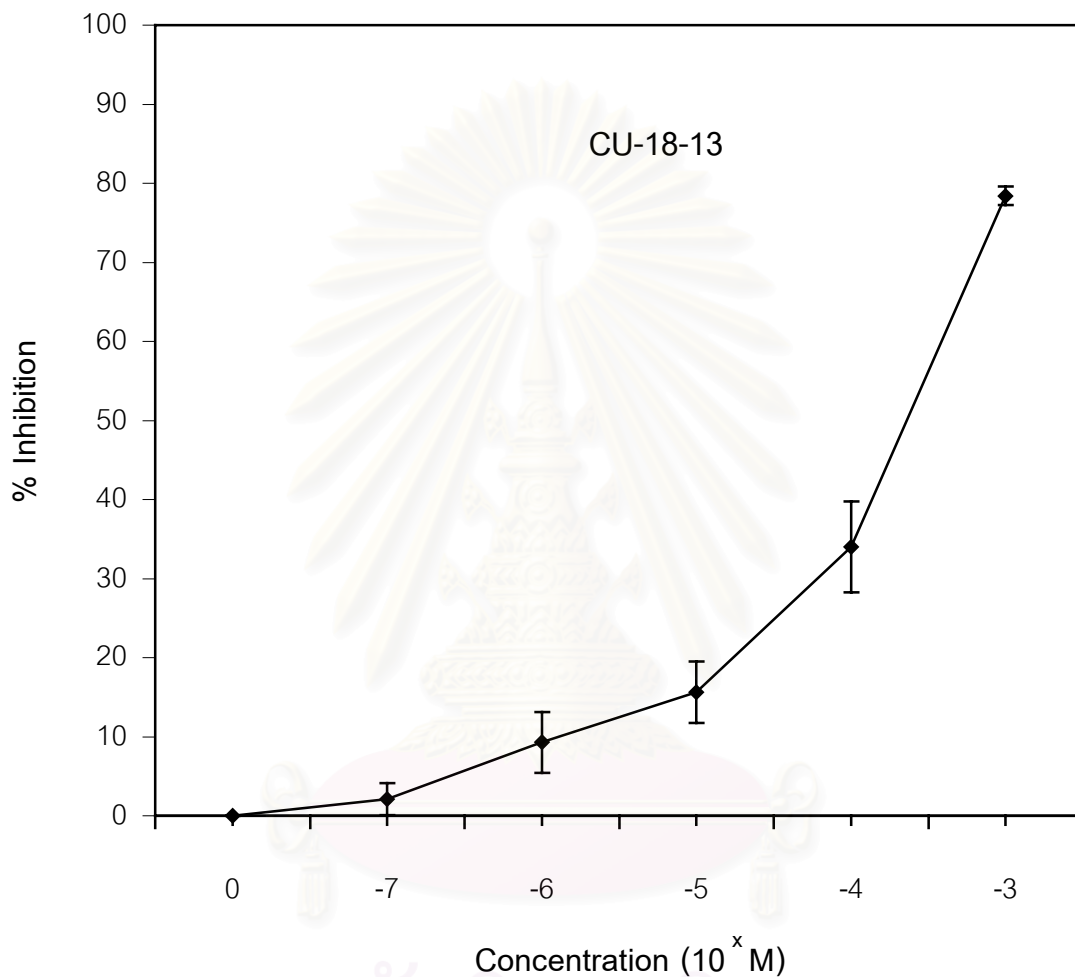
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24 % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโทคอนเดรียโดย CU-18-12 ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (n=4)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 25 % Inhibition ของการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรียโดย CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-7} ถึง 10^{-3} M เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (n=4)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดง % Inhibition การหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 ของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

สารทดสอบ	% Inhibition การหายใจของไมโตคอนเดรีย				
	10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M	10^{-3} M
CU-18-07	4.78 \pm 5.02	9.17 \pm 3.48	17.22 \pm 6.61	20.31 \pm 4.37	51.70 \pm 10.53
CU-18-08	7.85 \pm 9.34	10.38 \pm 8.49	18.20 \pm 4.54	55.74 \pm 9.35	65.21 \pm 2.84
CU-18-09	5.89 \pm 2.45	9.90 \pm 2.35	11.32 \pm 3.06	44.31 \pm 3.97	88.48 \pm 2.17
CU-18-10	9.01 \pm 11.59	14.46 \pm 9.71	24.29 \pm 11.97	40.74 \pm 9.65	78.61 \pm 3.31
CU-18-11	1.18 \pm 4.24	5.12 \pm 2.11	10.21 \pm 2.78	30.03 \pm 1.91	88.39 \pm 3.15
CU-18-12	2.37 \pm 3.30	4.00 \pm 3.74	9.31 \pm 4.45	67.58 \pm 2.05	88.39 \pm 3.64
CU-18-13	2.10 \pm 2.02	9.29 \pm 3.85	15.65 \pm 3.90	34.02 \pm 5.77	78.39 \pm 1.18

ตารางที่ 5 แสดงความสามารถในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

สารทดสอบ	IC_{50} (M)
CU-18-07	8.64×10^{-3}
CU-18-08	3.01×10^{-3}
CU-18-09	1.71×10^{-4}
CU-18-10	9.30×10^{-4}
CU-18-11	1.39×10^{-4}
CU-18-12	1.90×10^{-4}
CU-18-13	4.02×10^{-4}

รูปที่ 26 แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วย succinate (succinate oxidation)

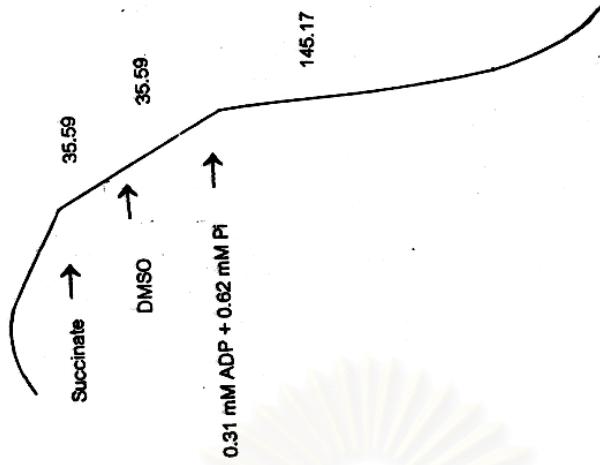
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 5.21 mM succinate และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 4.35 mg/ml ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms/ml/min

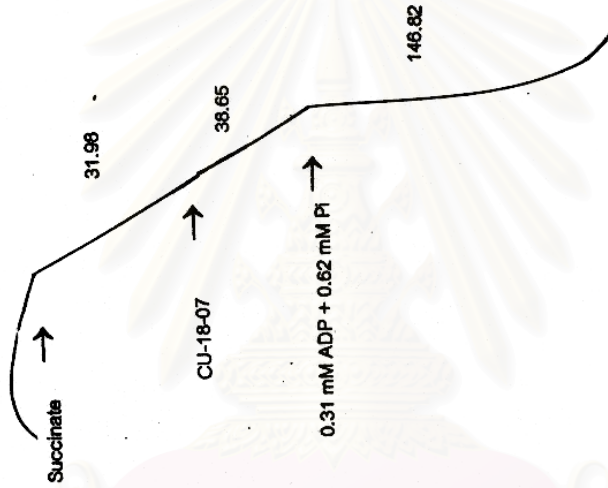


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

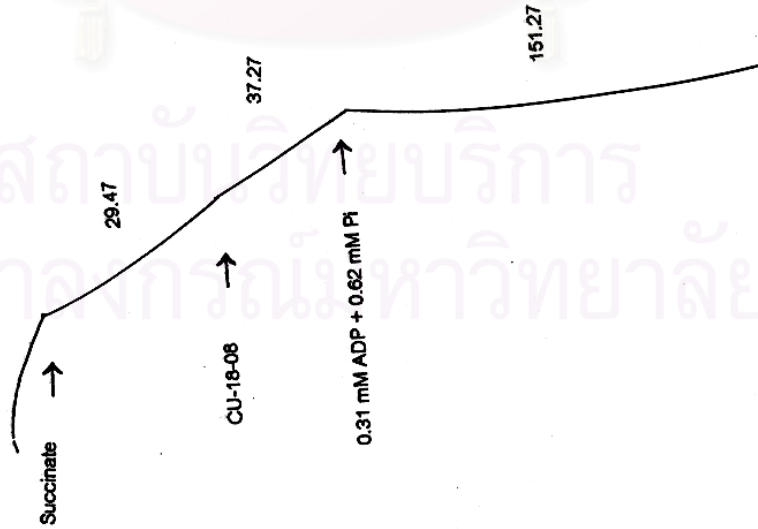
Tracing 1



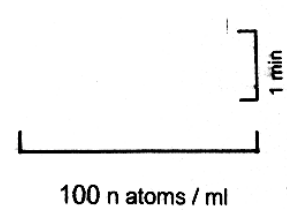
Tracing 2



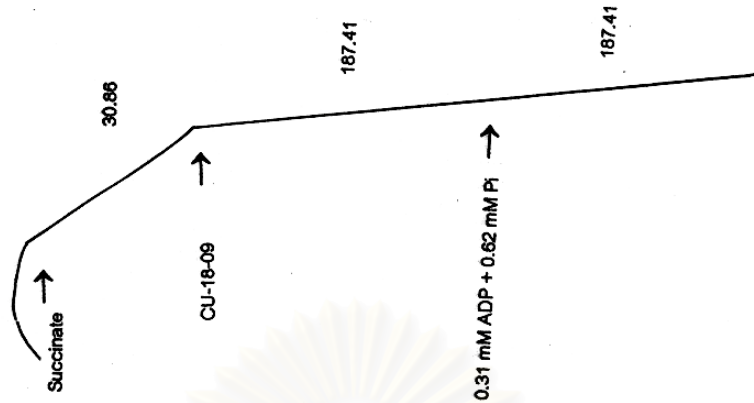
Tracing 3



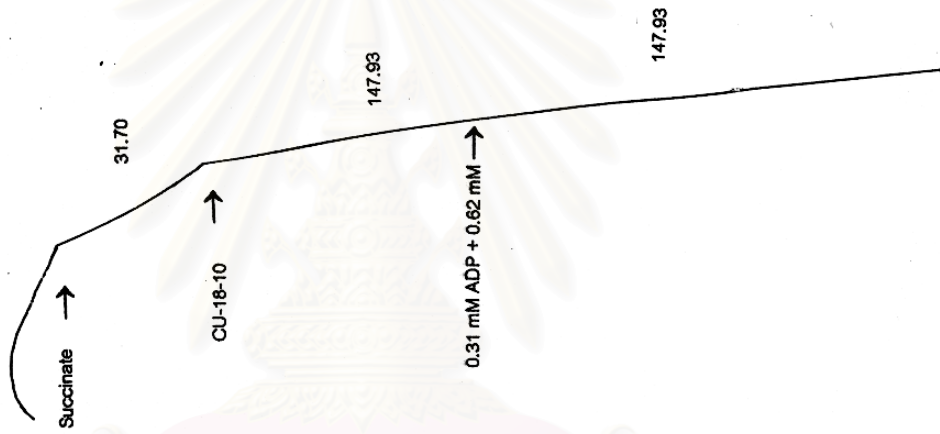
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



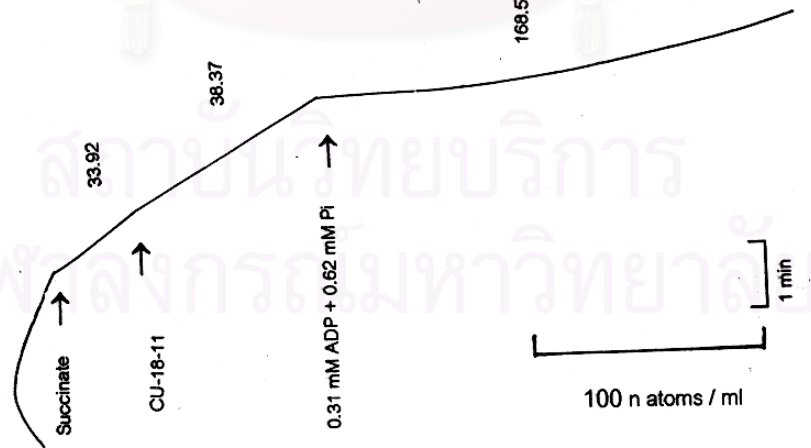
Tracing 4



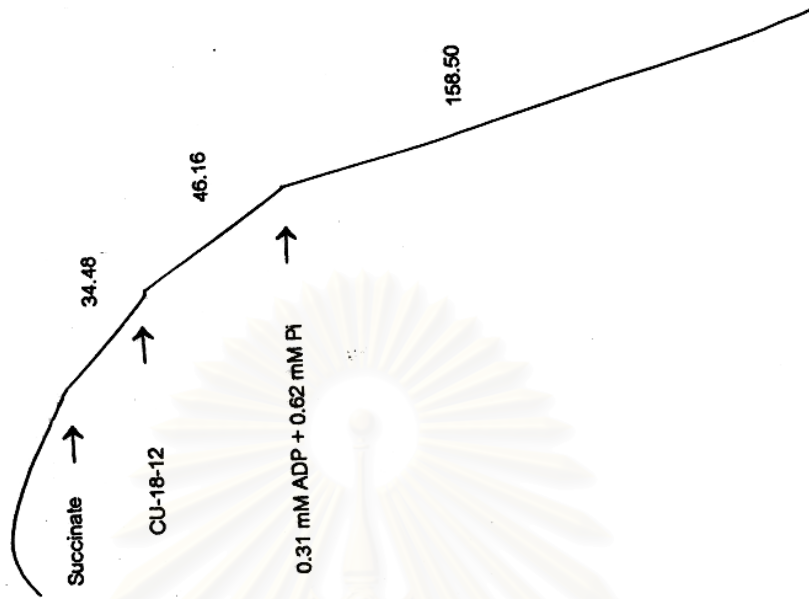
Tracing 5



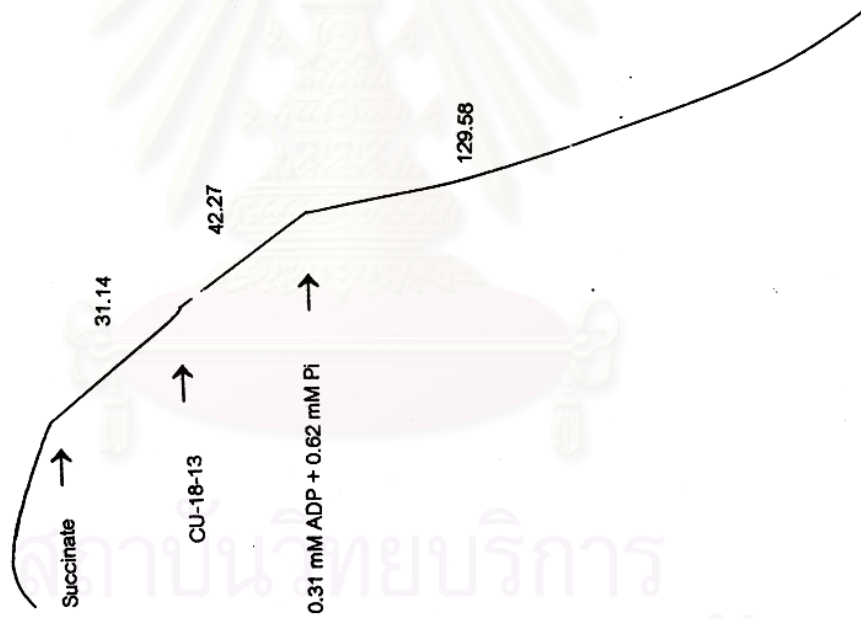
Tracing 6



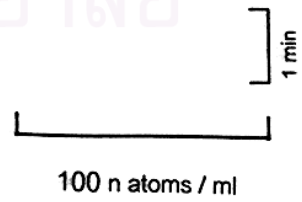
Tracing 7



Tracing 8



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศูนย์บริการ



ตารางที่ 6 แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 4 เมื่อใช้ succinate เป็น สับสเตรท

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

สารทดสอบ	Rate of O ₂ consumption state 4 (n atoms/ml/min)	
	ก่อนเติมสารทดสอบ	หลังเติมสารทดสอบ
CU-18-07	31.98 \pm 5.12	38.65 \pm 5.30
CU-18-08	29.47 \pm 4.00	37.26 \pm 5.50
CU-18-09	30.86 \pm 5.42	187.41 \pm 37.56 *
CU-18-10	31.70 \pm 4.20	147.93 \pm 2.78 *
CU-18-11	33.92 \pm 3.56	38.37 \pm 6.11
CU-18-12	34.48 \pm 4.59	46.16 \pm 6.12
CU-18-13	31.94 \pm 1.47	42.27 \pm 1.28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 แสดงผลของแคดเมียม (Cd^{2+}) [succinate oxidation inhibitor] ต่อการออกฤทธิ์ของ

CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M

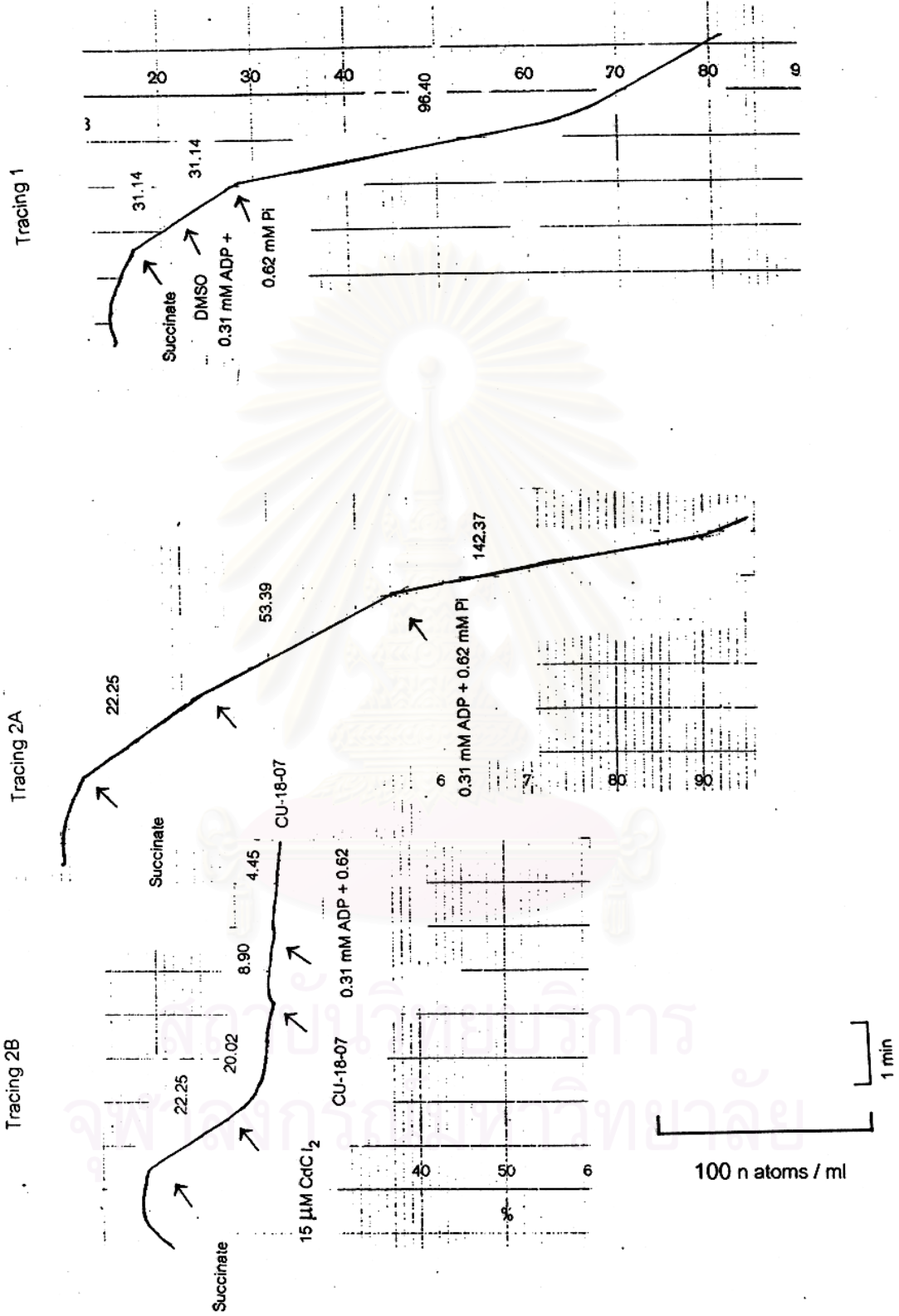
เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

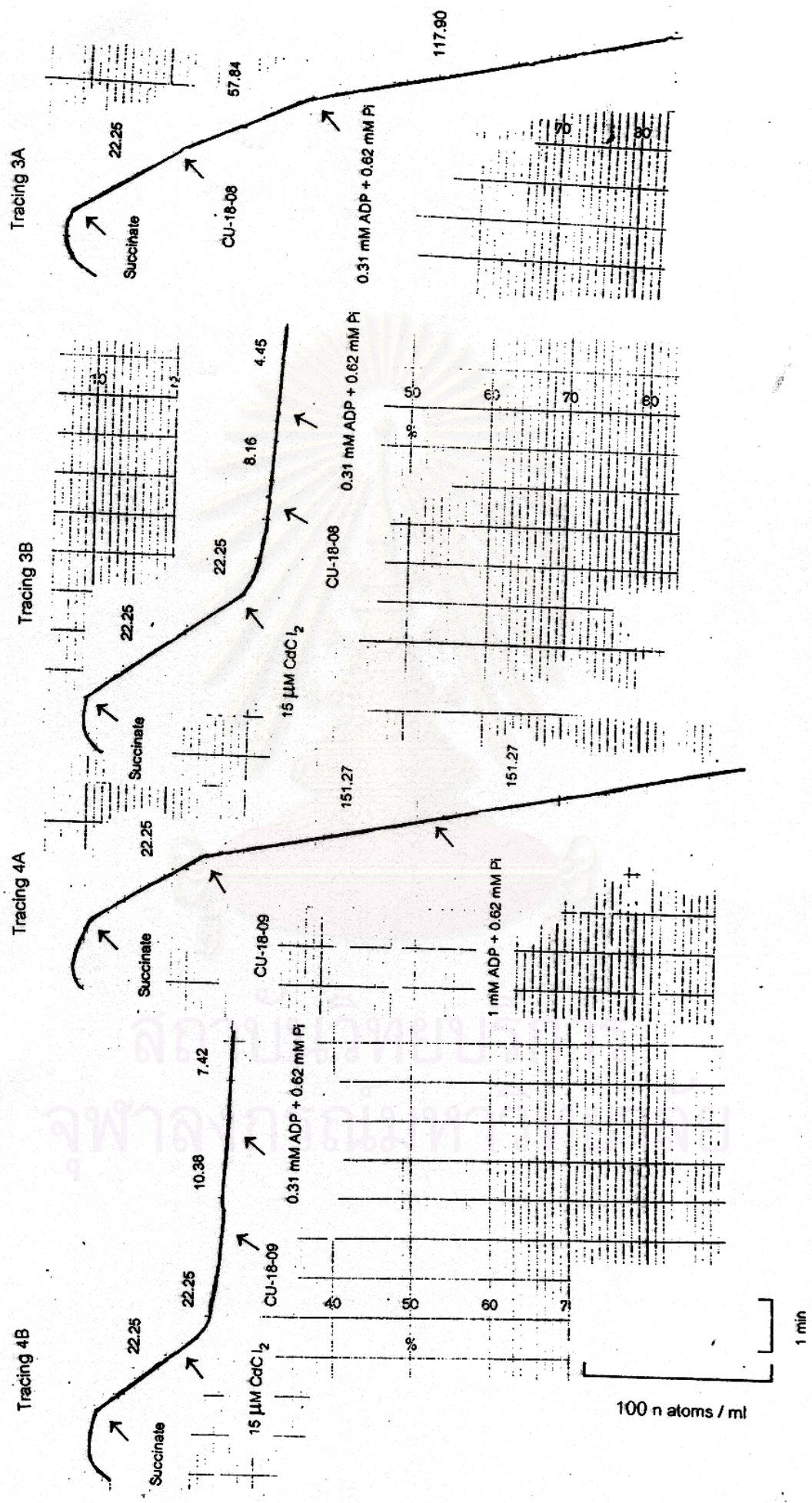
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ml, 15 μM CdCl_2 และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.92 mg/ml, ml ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms/ml/min

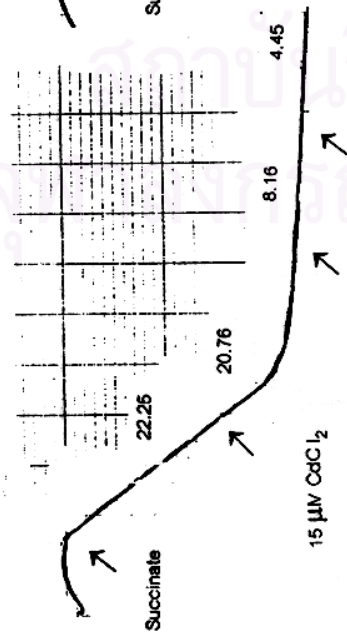


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

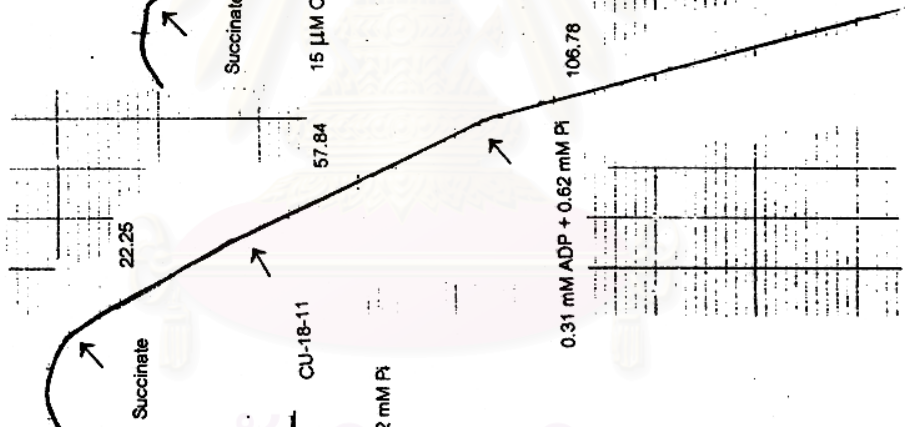




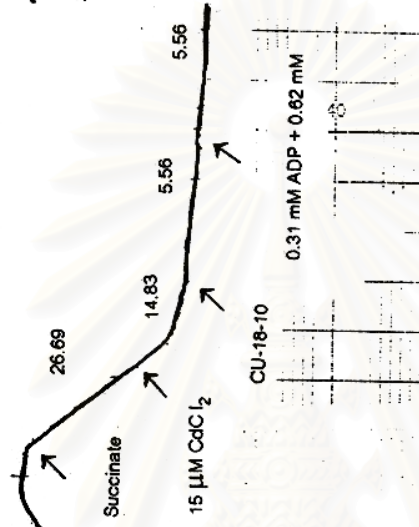
Tracing 6B



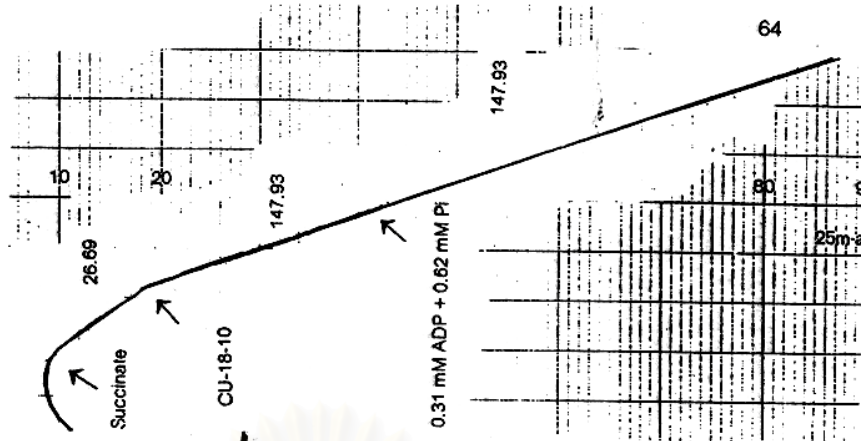
Tracing 6A



Tracing 5B



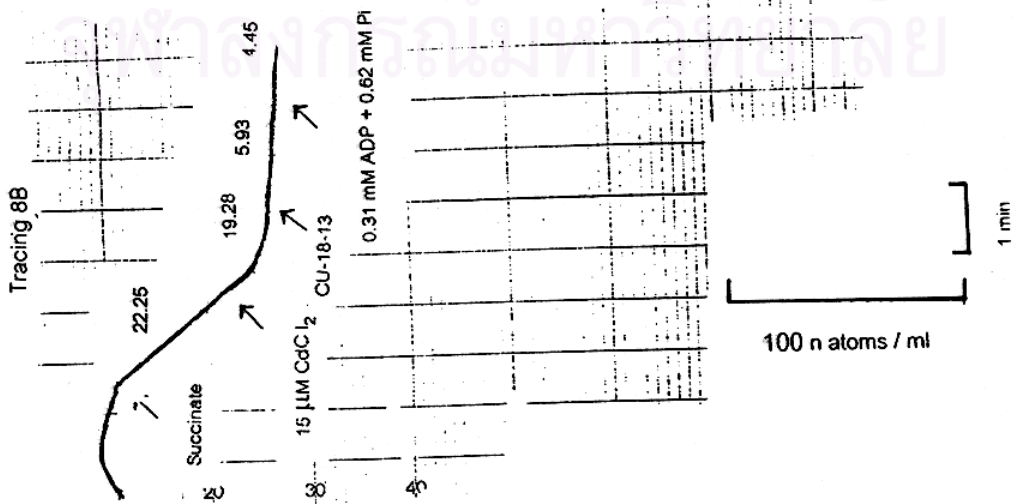
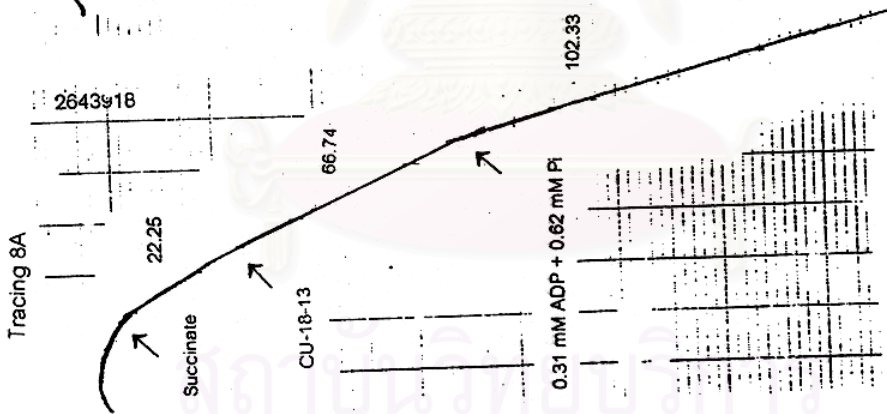
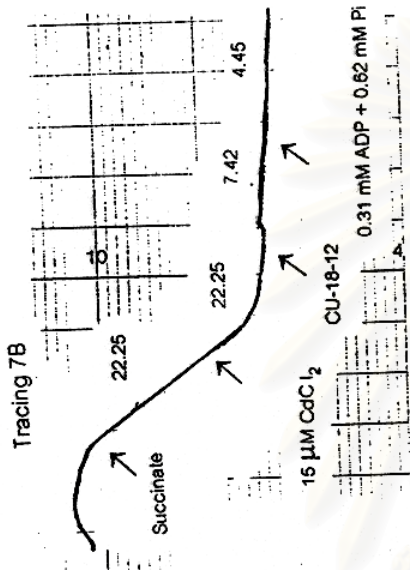
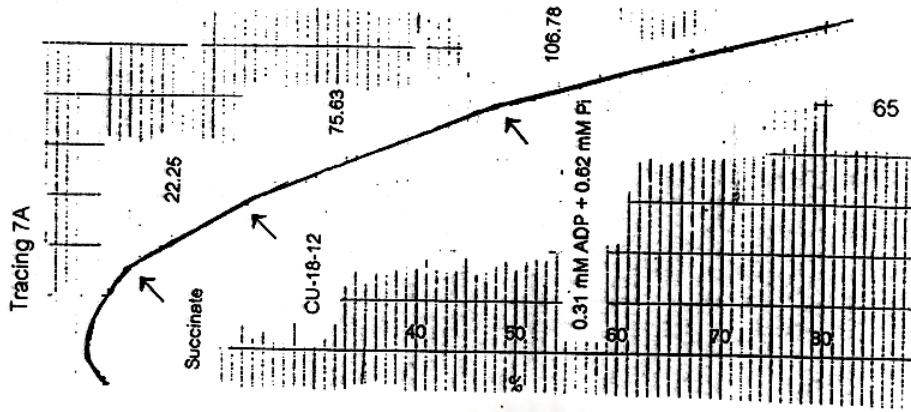
Tracing 5A



100 n atoms / ml

1 min

ศูนย์บริการ
มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 7 แสดงผลของ CdCl_2 ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

สารทดสอบ	Rate of O_2 consumption state 4 (n atoms/ml/min)	
	สภาวะที่มีสารทดสอบ	สภาวะที่มีสารทดสอบ+ CdCl_2
CU-18-07	53.39 \pm 1.82	8.90 \pm 1.86 *
CU-18-08	57.84 \pm 1.40	8.16 \pm 1.93 *
CU-18-09	151.27 \pm 9.61	10.38 \pm 2.23 *
CU-18-10	147.93 \pm 4.81	5.56 \pm 0.53 *
CU-18-11	57.84 \pm 1.11	8.16 \pm 1.40 *
CU-18-12	75.63 \pm 3.15	7.42 \pm 1.28 *
CU-18-13	66.74 \pm 4.80	5.93 \pm 0.64 *

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 28 แสดงผลของ rotenone ต่อการออกฤทธิ์ร่วมกันกับ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M

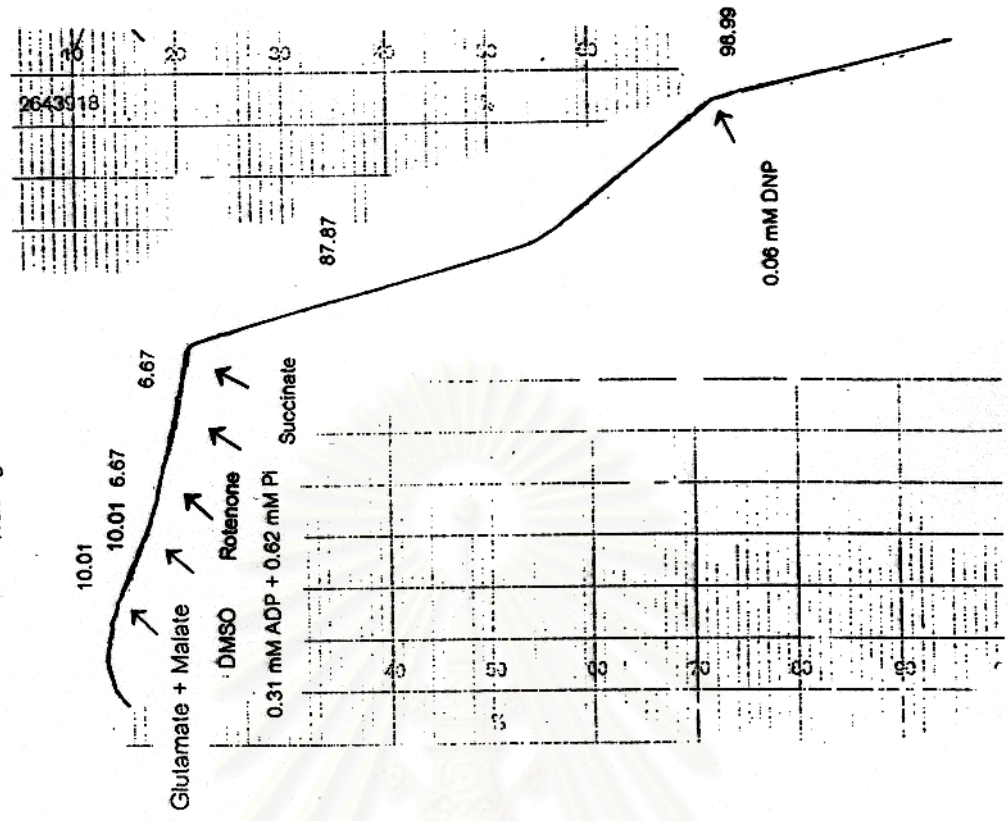
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 potassium malate, 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose, rotenone 2.5×10^{-6} M และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.59 mg/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 C^0

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms/ml/min

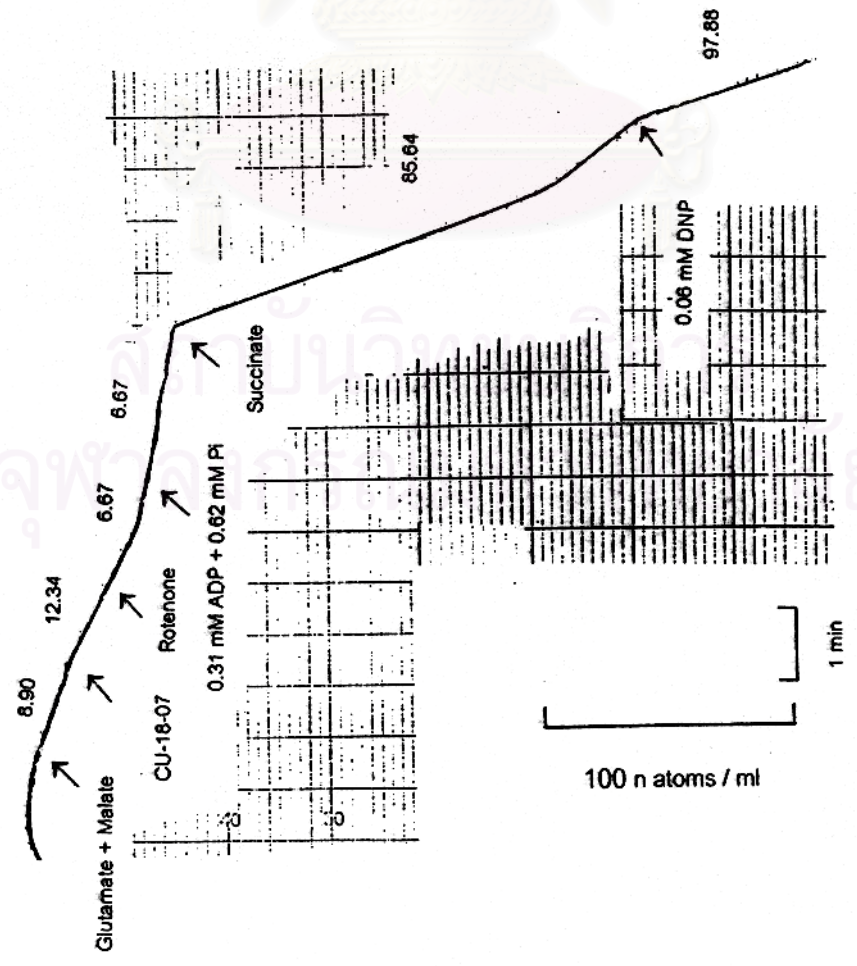


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

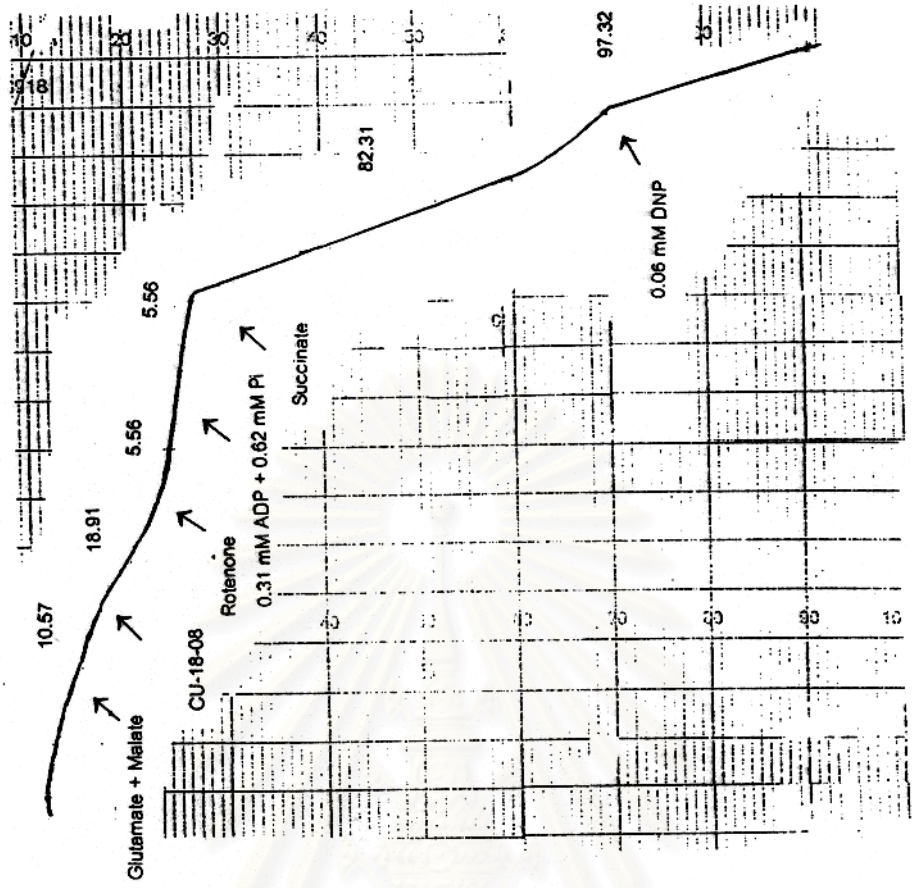
Tracing 1



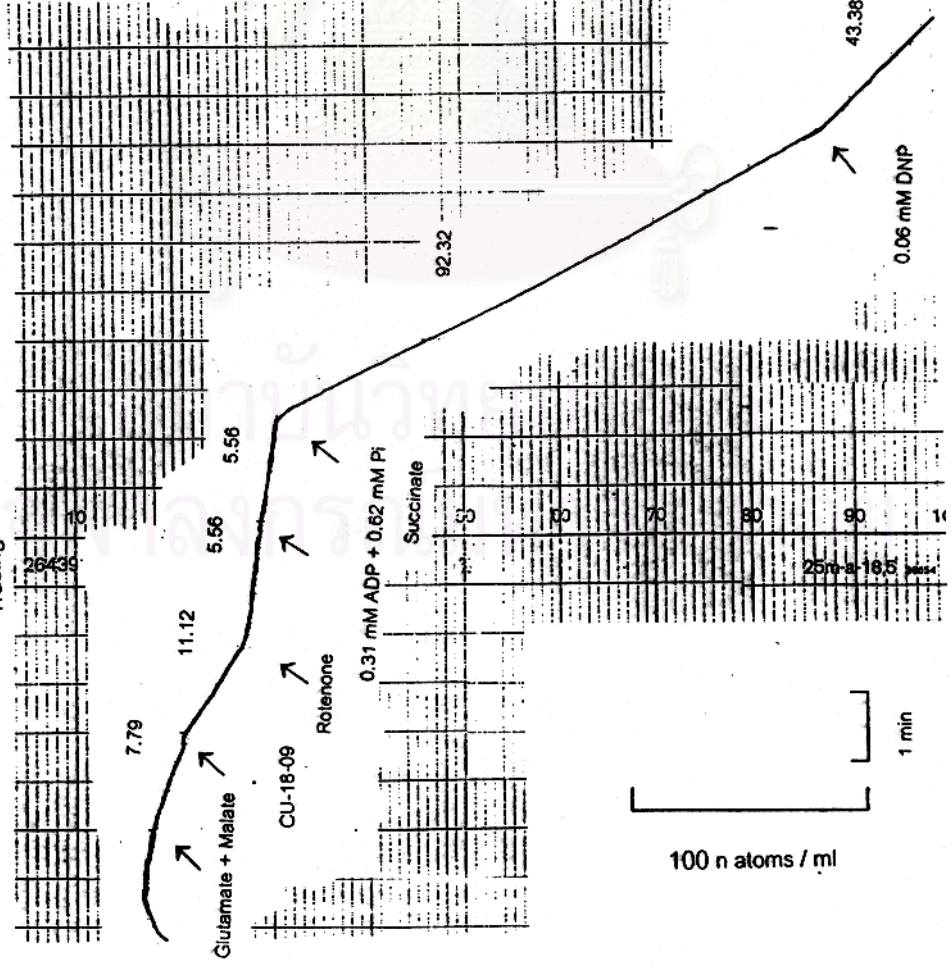
Tracing 2



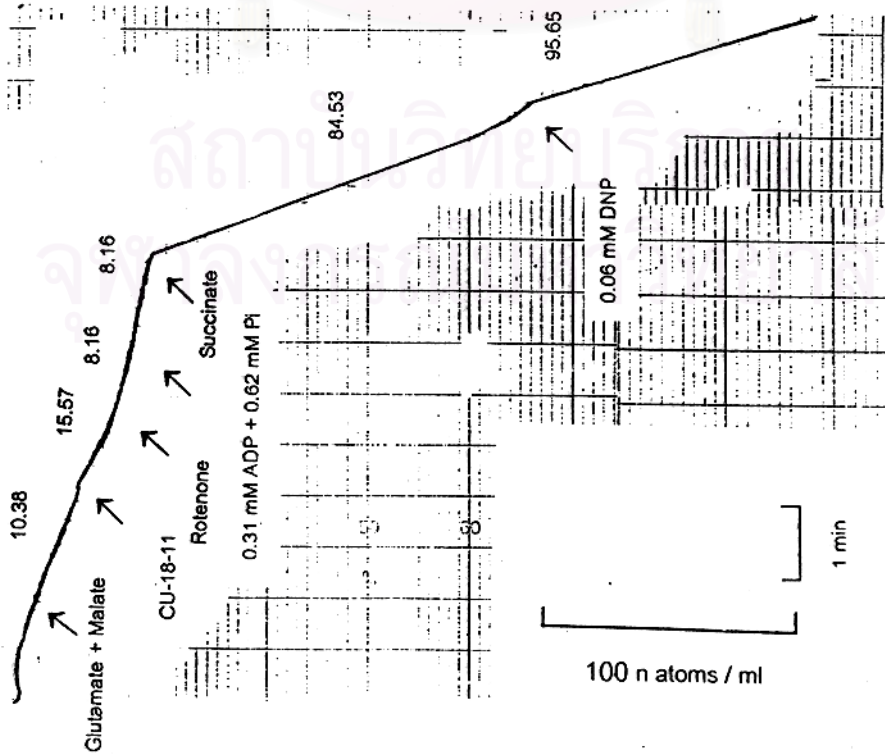
Tracing 3



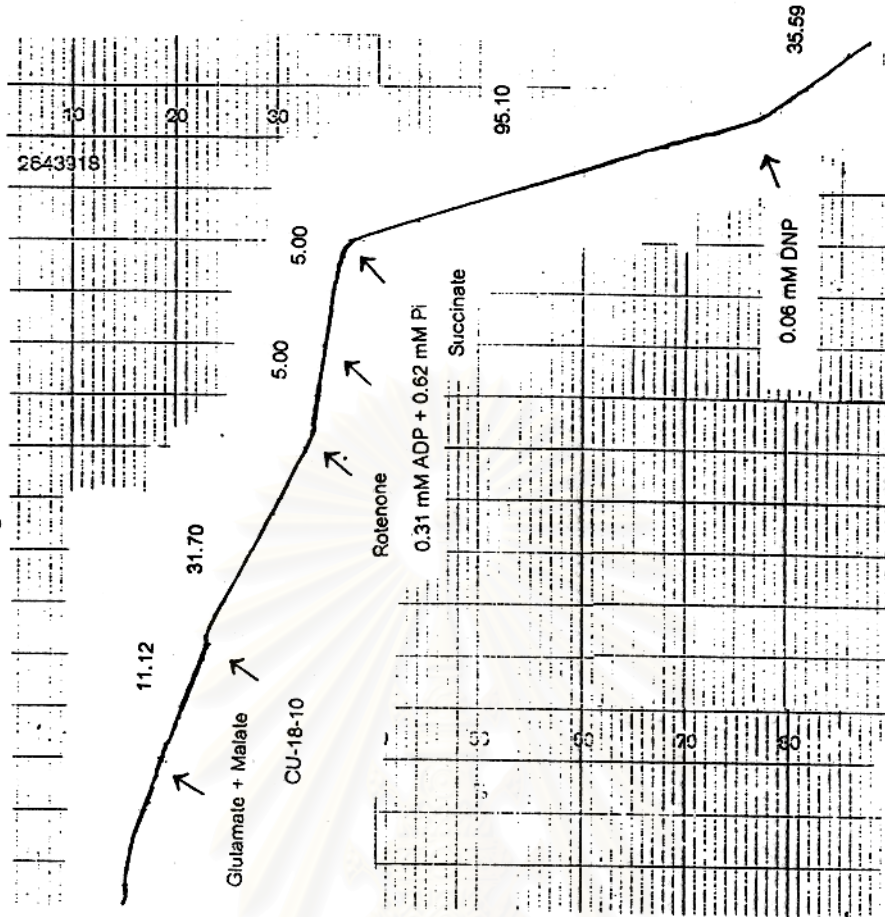
Tracing 4



Tracing 6

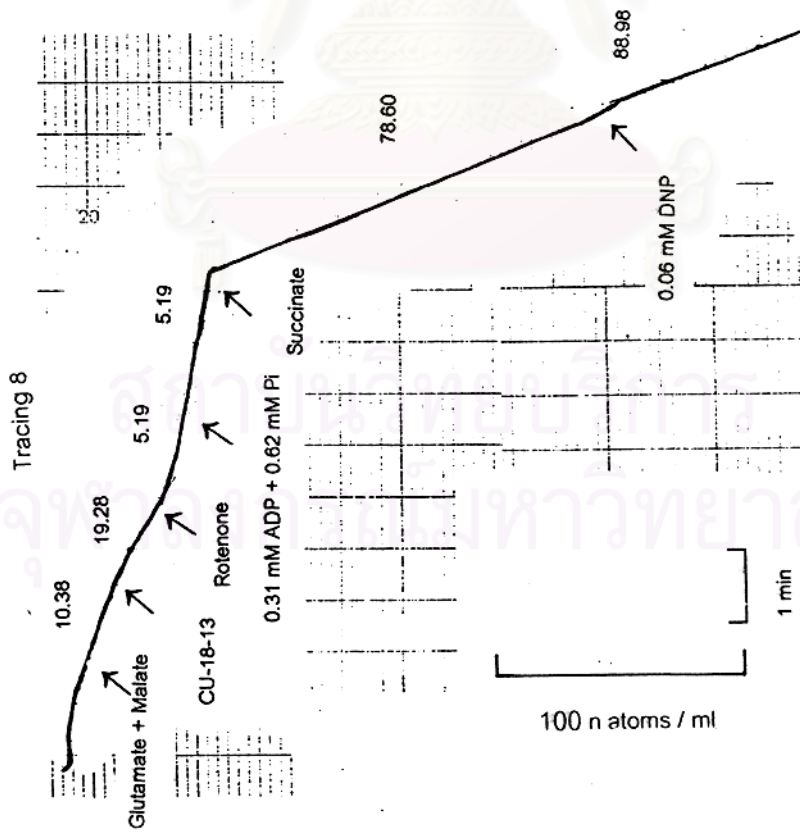
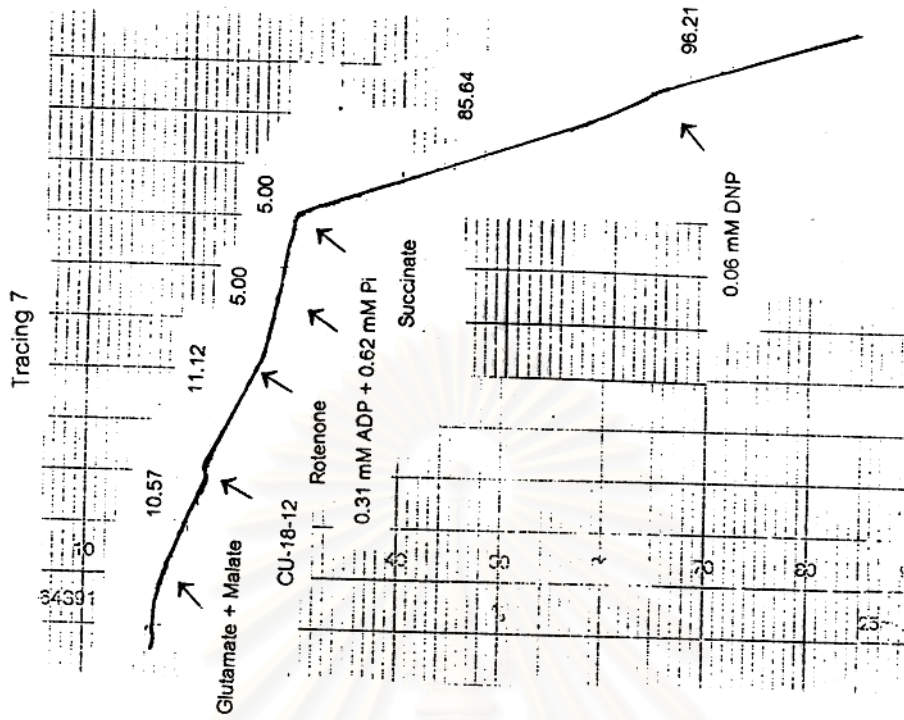


Tracing 5



100 n atoms / ml

1 min



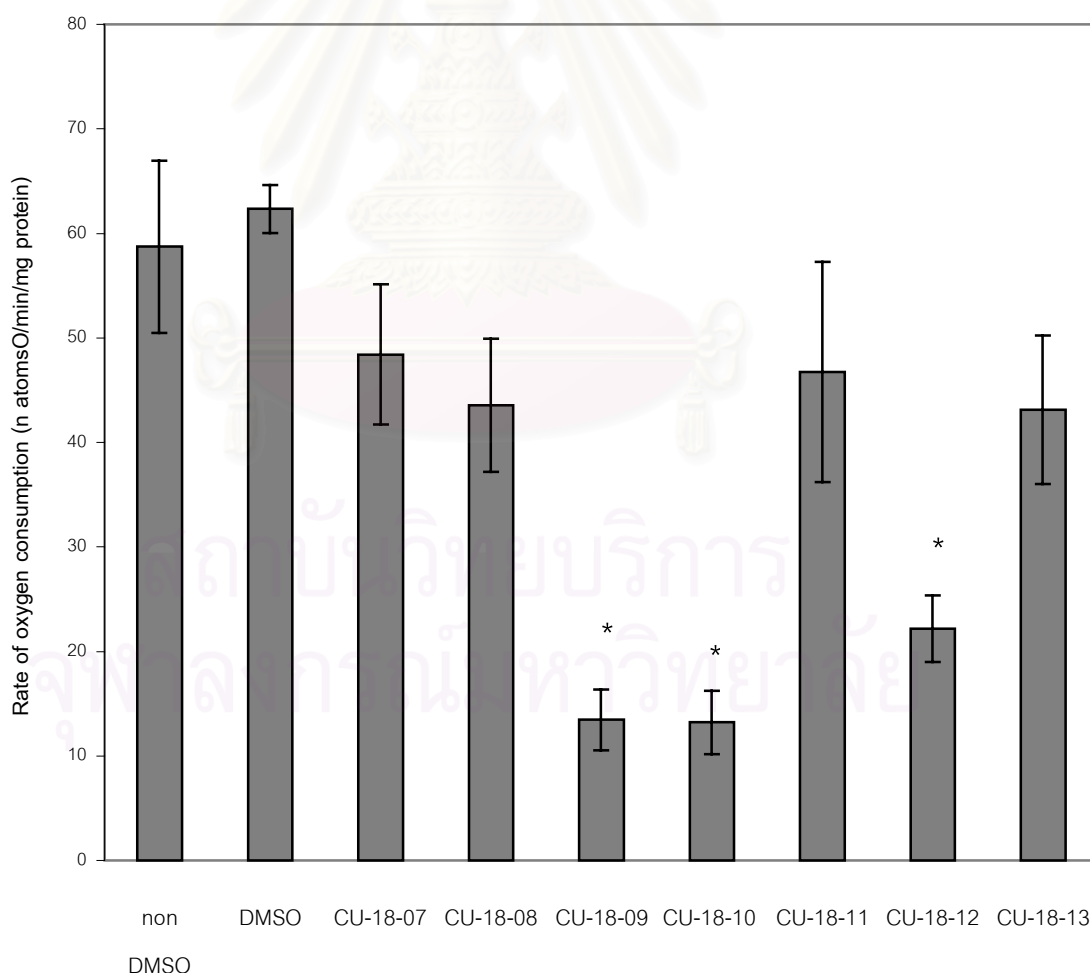
รูปที่ 29 แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.05 mM DNP และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 4.59 mg/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 C^0

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

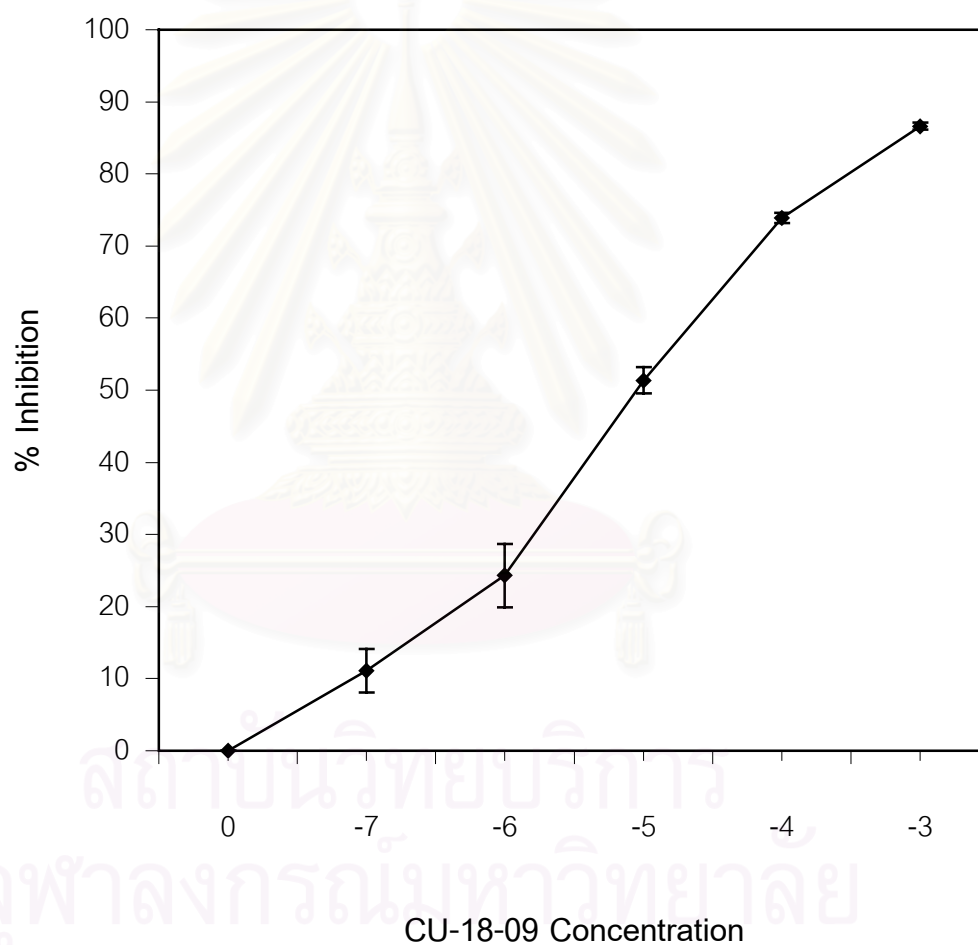
ผลต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP



รูปที่ 30 แสดง % Inhibition ของ CU-18-09 ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.05 mM DNP และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 4.59 mg/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 C⁰

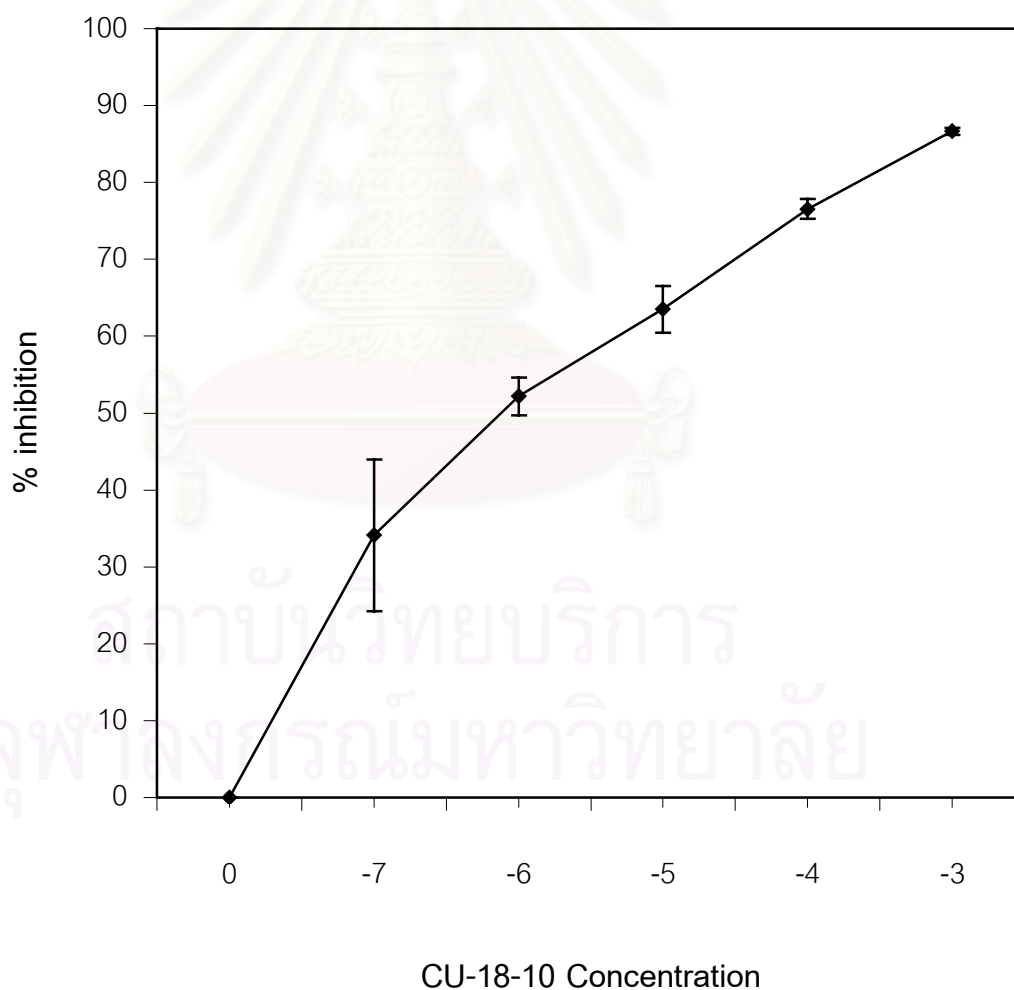
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง(n=4)



รูปที่ 31 แสดง % Inhibition ของ CU-18-10 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.59 mg/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37C⁰

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง(n=4)



ตารางที่ 8 แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 MgCl_2 , 86.25mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mMPi, 0.05 DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.59 mg/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

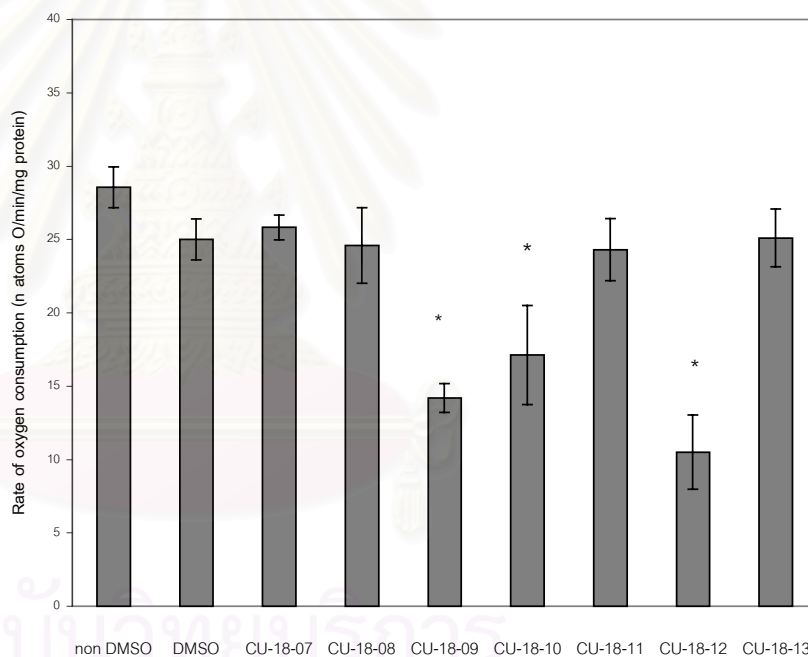
สารทดสอบ	Rate of O_2 consumption state 3u (n atoms/min/mg protein)
DMSO+ DNP (control)	62.33 ± 2.31
CU-18-07 + DNP	48.47 ± 6.72
CU-18-08+ DNP	43.53 ± 6.36
CU-18-09+ DNP	13.46 ± 2.90 *
CU-18-10+ DNP	13.21 ± 3.03 *
CU-18-11+ DNP	46.74 ± 10.51
CU-18-12+ DNP	22.18 ± 3.19 *
CU-18-13+ DNP	43.12 ± 7.10

รูปที่ 32 แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วย แคลเซียม (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.94 mM potassium phosphate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.42 mM CaCl_2 และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.94 mg/ml, ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ $37\text{ }^\circ\text{C}$

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



สถาบันวิจัยชีววิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

สารทดสอบ	Rate of O ₂ consumption (n atoms/min/mg protein)
DMSO	26.04 \pm 0.60
CU-18-07	25.82 \pm 0.84
CU-18-08	24.59 \pm 2.58
CU-18-09	14.19 \pm 0.97 *
CU-18-10	16.26 \pm 3.38 *
CU-18-11	24.31 \pm 2.12
CU-18-12	10.50 \pm 2.53 *
CU-18-13	25.11 \pm 1.97

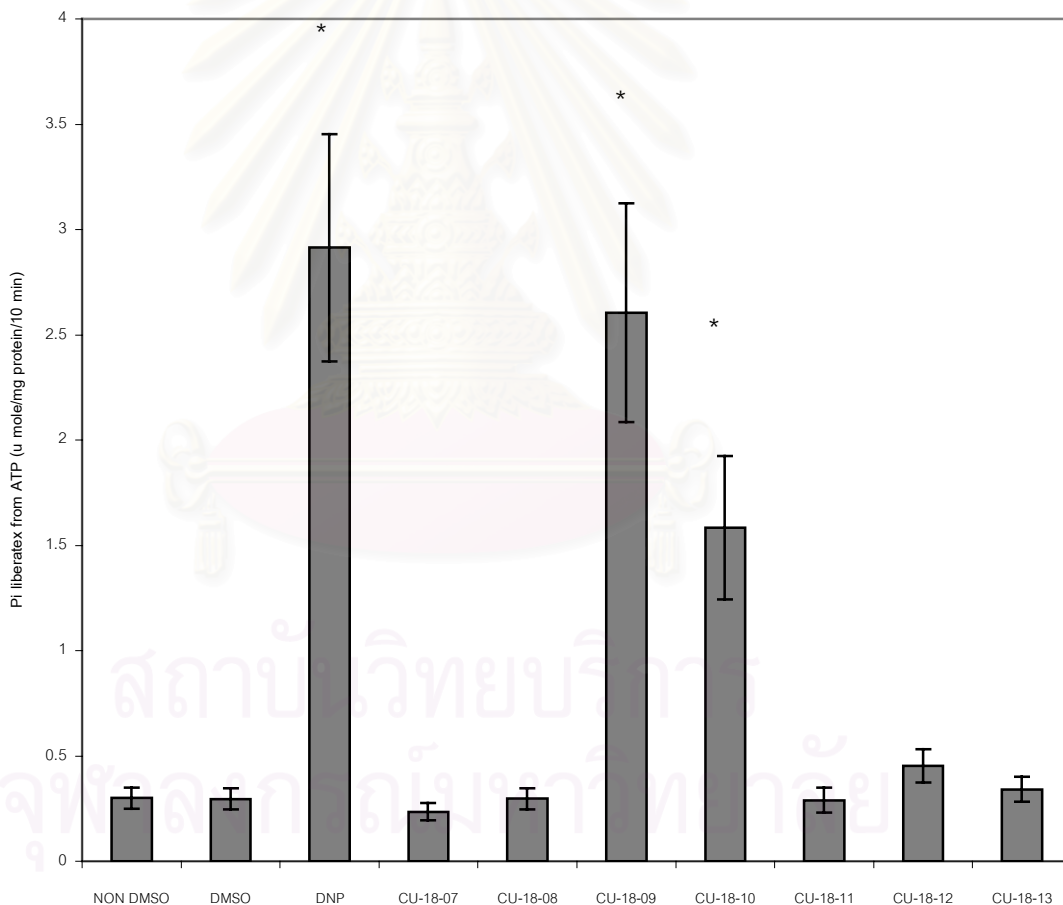
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 33 แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.74 MgCl_2 , 81.17 mM KCl, 16.78 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 4.95 mg/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.03 mM ATP, 0.10 mM DNP, ปริมาตรทั้งหมด 2.98 ml. อุณหภูมิ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



ตารางที่ 10 แสดงผลของ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ความเข้มข้น 10^{-4} M และ 10 mM DNP ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

สารทดสอบ	Pi liberate (μ moles/mg protein/10 min)
DMSO	0.30 ± 0.05
CU-18-07	0.24 ± 0.04
CU-18-08	0.30 ± 0.05
CU-18-09	$1.60 \pm 0.52^*$
CU-18-10	$1.58 \pm 0.34^*$
CU-18-11	0.29 ± 0.06
CU-18-12	0.45 ± 0.08
CU-18-13	0.34 ± 0.06
DNP	$2.91 \pm 0.54^*$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาผลการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนที่ได้มีการปรับปรุงสูตรโครงสร้างจำนวนทั้งสิ้น 7 ตัวต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว พบว่าสารทั้ง 7 ตัวแสดงฤทธิ์รบกวนกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ นอกจากนี้ยังศึกษาถึงผลของอนุพันธ์ที่มีต่อการหายใจที่กระตุ้นด้วย DNP และ Ca^{2+} ตลอดจนผลต่อการทำงานของ ATPase ซึ่งรายละเอียดผลการทดลองสามารถอภิปรายฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือพิษวิทยาได้ดังต่อไปนี้

1. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

จากการศึกษาผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ซึ่งได้แก่ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท พบว่าสารทุกตัวออกฤทธิ์ยับยั้งการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียมากขึ้นตามความเข้มข้น (dose dependent) (รูปที่ 19-25)

โดยความแรงในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย (IC_{50}) จากน้อยไปมากสรุปได้ดังนี้คือ CU-18-07, CU-18-08, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-12, CU-18-09, CU-18-11 ตามลำดับ โดยตำแหน่งแห่งการออกฤทธิ์ยับยั้งอาจอยู่ที่ site I ของลูกโซ่การหายใจ

2. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนต่อการออกซิเดชันของ succinate

จากผลการศึกษาผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนต่อการออกซิเดชันของ succinate พบว่าอนุพันธ์ทุกตัวมีฤทธิ์กระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate ได้ ซึ่งจะเห็นได้จากการที่อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน เพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ซึ่งฤทธิ์ในการกระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate จะเห็นได้อย่างชัดเจนใน CU-18-09 และ CU-18-10 (รูปที่ 26) ซึ่งคาดว่าอนุพันธ์ดังกล่าวน่าจะมีฤทธิ์เป็น uncoupler เช่นเดียวกับในกรณีของ melatonin ที่กระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate ได้ (Scott et al., 2000)

3. ผลของแคดเมียมต่อการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ใน Krebs cycle นั้น succinate จะถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ succinate dehydrogenase (ซึ่งเป็น flavin-linked enzyme) ได้เป็น fumarate พร้อมกับเปลี่ยน FAD ไปเป็น FADH_2 (Devin, 1997) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะถูกยับยั้งได้ด้วย Cd^{2+} (Miccadei and Floridi, 1993) จากผลการศึกษาพบว่าการเติม

CU-18-07, CU-18-08 ,CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ลงไปในปฏิกิริยาไม่สามารถจะต่อต้านผลการยับยั้งเอนไซม์ succinate dehydrogenase โดย Cd^{2+} ได้ ซึ่งจะเห็นได้จากการที่ Cd^{2+} สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration จากการกระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate จากอนุพันธ์ดังกล่าวได้ (รูปที่ 27) แสดงว่าอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ไม่ใช่ antidote สำหรับ Cd^{2+} ในกรณีที่ยับยั้ง succinate dehydrogenase ของไมโตคอนเดรีย หรือในทางตรงข้าม Cd^{2+} สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate จากอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนได้

4. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน กับ rotenone ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

rotenone เป็นสารที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ใน complex I (site I inhibitor) ซึ่งเมื่อทำการเติม rotenone ลงไป incubation medium พบว่า rotenone จะยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรตได้ เนื่องจากสับสเตรตดังกล่าวจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง ubiquinone ซึ่งเป็น site I ของลูกโซ่การหายใจแต่ไม่สามารถยับยั้งการหายใจเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรตได้ เนื่องจากสารดังกล่าวสามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอน ไปยัง ubiquinone ได้โดยตรง (site II) (Danishefsky, 1980 ; Hatefi,1985 ; Cambell,1995) และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรต แต่ไม่ยับยั้งการหายใจเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรต แสดงว่าอนุพันธ์ดังกล่าวออกฤทธิ์ยับยั้งที่ site I ของลูกโซ่การหายใจเช่นเดียวกับ rotenone

จากผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน กับ rotenone พบว่าอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนทุกตัวไม่ได้มีผลเสริมฤทธิ์หรือยับยั้งฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของ rotenone (รูปที่ 28) แต่เนื่องจากขนาดของ rotenone ที่ใช้จะค่อนข้างสูง ดังนั้นหากต้องการศึกษาปฏิสัมพันธ์กับ rotenone ต่อไปควรมีการลดขนาดของ rotenone ลง

5. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่การกระตุ้นด้วย DNP

DNP เป็นสาร uncoupler ซึ่งออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้โดยไม่ทำให้เกิดการสร้าง ATP (Lehninger et al., 2000) จากผลการศึกษาพบว่า CU-18-07, CU-18-08, CU-18-11, และ CU-18-13 ไม่มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP ส่วนอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนซึ่งได้แก่ CU18-09 , CU18-10 และอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนซึ่งได้แก่ CU 18-12 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP ได้โดยอาจไปรบกวนคุณสมบัติในการเป็น proton ionophores ของ DNP (รูปที่ 29) และฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจที่กระตุ้นด้วย DNP ของ CU-18-09 และ CU-18-10 จะเพิ่มตามความเข้มข้น (รูปที่ 30-31)

6. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+} (Calcium-stimulated respiration)

เนื่องจากการขนส่งแคลเซียมเข้าไปในไมโทคอนเดรียเป็นขบวนการ active transport ซึ่งจำเป็นต้องใช้พลังงานโดยพลังงานดังกล่าวจะได้จากลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย มีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมาและไมโทคอนเดรียจะรักษาพลังงานไว้ในรูปของ proton gradient และ membrane potential เมื่อมีการเติม CaCl_2 ลงไปในปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทมากพอและมี Pi อยู่ พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเพิ่มสูงขึ้นและอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเมื่อ Ca^{2+} ถูกสะสมเข้าไปในไมโทคอนเดรียหมดแล้ว

จากการศึกษาพบว่าอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนมีผลต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+} แตกต่างกันโดยพบว่า อนุพันธ์เอซิลอะนิลีน ซึ่งได้แก่ CU 18-09, CU 18-10 และอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนซึ่งได้แก่ CU 18-12 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+} ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 32)

6. ผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีน ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

จากผลการศึกษาผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและเอซิลอะนิลีนที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย พบว่า CU-18-07, CU-18-08, CU-18-11, CU-18-12, CU-18-13 ไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity

ส่วน CU-18-09, CU-18-10 มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ระหว่าง CU-18-09, CU-18-10 กับ DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler ทำให้เกิดการสลายตัวของ ATP (ATP hydrolysis) ดังนั้น Pi ถูกปล่อยออกมาเพิ่มขึ้นด้วย (Cambell, 1995 ; Lehninger et al., 2000 ; Garrett and Grisham, 2002) ไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 33) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า CU-18-09 และ CU-18-10 มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity ได้เช่นเดียวกับ DNP จากการศึกษาทั้งหมดข้างต้นสามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 สรุปผลของอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนและเอซิลอะมิโนไพริดีนที่มีอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียและ ATPase activity

สารทดสอบ	การหายใจของไมโทคอนเดรียและ ATPase activity					
	การหายใจเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	การออกซิเดชันของ succinate	การหายใจในภาวะที่มี CdCl_2	การหายใจที่กระตุ้นด้วย DNP	การหายใจที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+}	ATP ase activity
CU-18-07	-	+	-	+	+	0
CU-18-08	-	+	-	+	+	0
CU-18-09	-	++	-	-	-	+
CU-18-10	-	++	-	-	-	+
CU-18-11	-	+	-	+	+	0
CU-18-12	-	+	-	-	-	0
(CU 763-16-04)						
CU-18-13	-	+	-	+	+	0

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + แสดงฤทธิ์ในการกระตุ้น
 - แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง
 0 แสดงว่าไม่มีผลในการกระตุ้นหรือยับยั้ง

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและอนุพันธ์เอซิลอะนิลีน

จากการพิจารณาโครงสร้างของสารร่วมกับการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและอนุพันธ์เอซิลอะนิลีน หากพิจารณาหมู่ของสารที่เติมลงไปบน benzene ring พบว่าการเติมหมู่ $-OCH_3$ (CU-18-07 และ CU-18-08) หรือหมู่ $-NO_2$ (CU-18-09 และ CU-18-10) หรือการแทนที่ Carbon atom ด้วย Nitrogen atom (CU-18-11 และ CU-18-12) หรือไม่มีการเติมด้วยหมู่ใดเลย (CU-18-13) จะมีคุณสมบัติที่เหมือนกันคือ การออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท และการกระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate ที่สามารถถูกยับยั้งฤทธิ์ดังกล่าวได้ด้วย Cd^{2+} เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการกุดการหายใจของสารดังกล่าวพบว่าสารที่มีการเติมหมู่ $-OCH_3$ จะกุดการหายใจน้อยที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งที่มีการเติมหมู่ $-NO_2$ ไม่ว่าจะที่ตำแหน่ง meta หรือ para ก็ตาม จะเพิ่มฤทธิ์ในการกระตุ้นออกซิเดชันของ succinate มากขึ้น , มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity และจะมีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย Ca^{2+} และ DNP แต่ความแรงในการยับยั้งการหายใจที่ complex I จะต่างกันกล่าวคือ การเติมหมู่ $-NO_2$ ในตำแหน่ง para (CU-18-09) จะแรงกว่าตำแหน่ง meta (CU-18-10) ถึง 5 เท่า

นอกจากนี้ยังพบว่าอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีน หากมีการแทนที่ Carbon atom ด้วย Nitrogen atom ที่ตำแหน่ง para ซึ่งคือ CU-18-12 จะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการได้ คือ จะมีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย Ca^{2+} และ DNP ได้ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวจะไม่พบหากแทนที่ Carbon atom ด้วย Nitrogen atom ที่ตำแหน่ง meta

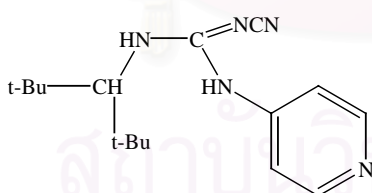
จากการศึกษาข้างต้นสรุปผลของอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนต่อหน้าที่กระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ดังนี้

1. อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนทั้ง 7 ตัวออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ site I ของลูกลูโซการหายใจ
2. อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนทั้ง 7 ตัวออกฤทธิ์กระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate ได้ โดยคาดว่า CU-18-09 และ CU-18-10 น่าจะออกฤทธิ์เป็น uncoupler ซึ่งฤทธิ์ในการกระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย Cd^{2+}
3. การให้อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนทั้ง 7 ตัวร่วมกับ rotenone ไม่ได้มีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของ rotenone
4. อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนได้แก่ CU-18-12 และอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนได้แก่ CU-18-09, CU-18-10 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP ได้
5. อนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนได้แก่ CU-18-12 และอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนได้แก่ CU-18-09, CU-18-10 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+} ได้
6. อนุพันธ์เอซิลอะนิลีนได้แก่ CU-18-09, CU-18-10 ออกฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

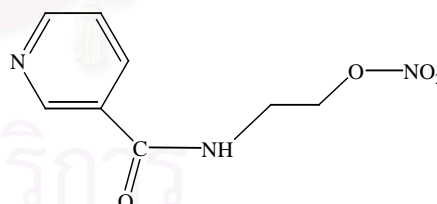
จากการพัฒนาปรับปรุงโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอซิลอะมิโนไพริดีนและอนุพันธ์เอซิลอะนิลีนโดยคาดหวังให้สารดังกล่าวมีฤทธิ์กดการหายใจของไมโทคอนเดรียน้อยที่สุด แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO มากที่สุด อย่างไรก็ตามจากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้นพบว่าสารดังกล่าวยังออกฤทธิ์กดการหายใจอยู่ด้วยความแรงแตกต่างกัน ซึ่งในสารที่นำมาศึกษาพบว่า CU-18-07 มีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจน้อยที่สุด (IC_{50} เท่ากับ $8.64 \times 10^{-3} M$)

จากการศึกษาของ Tatiya (2002) พบว่าอนุพันธ์เอซิลอะนิลีน คือ CU-18-08 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.85 \times 10^{-5} M$ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้นพบว่าสารดังกล่าวยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียไม่แรงมาก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.01 \times 10^{-3} M$ ดังนั้น CU-18-08 จึงมีความเหมาะสมในการศึกษาเพื่อพัฒนาโครงสร้างและปรับปรุงสารเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ต่อไป

จากการพิจารณาสูตรโครงสร้างของ CU-18-11 และ CU-18-12 เปรียบเทียบกับยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์เป็น K^+ channel opener (Potassium channel opener) เช่น pinacidil และ nicorandil พบว่า CU-18-11 และ CU-18-12 มีโครงสร้างบางส่วนคล้ายกับ pinacidil และ nicorandil ประกอบกับการปิดเปิดของ K^+ channel นั้นถูกควบคุมด้วยปริมาณของ ATP และเรียก K^+ channel นี้ว่า ATP-regulated K^+ channel (K_{ATP} channel) กล่าวคือ เมื่อมี ATP ปริมาณมากก็จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการปิดของ K_{ATP} channel ซึ่งถ้าหากปริมาณ ATP ลดลงจนถึงจุดวิกฤตก็ไม่สามารถปิด K_{ATP} channel ได้ (Garlid et al., 1996 ; Messerli, 1996 ; Szewczyk and Wojtczak, 2002) เนื่องจากสาร CU-18-11 และ CU-18-12 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ ซึ่งจะทำให้ได้ ATP ลดลง ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดการเปิดของ K_{ATP} channel ได้ ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาและพัฒนาสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ CU-18-11 และ CU-18-12 เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการเปิด K_{ATP} channel ได้



(A) Pinacidil



(B) Nicorandil

รูปที่ 34 แสดงโครงสร้างของยาในกลุ่ม K^+ channel opener ได้แก่ Pinacidil (A) และ Nicorandil (B) (Hansch et al., 1990)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

อุ้นเรือน แก้วพินิจ. 2541. ผลของ CU 763-15-13 ต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัญชิษฐา ทิพย์วงศ์จิตร. 2543. ผลของอนุพันธ์ของ เอ็น - เอซิโลอะมิโนไพริดีน ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไมโทเอมีนออกซิเดสและกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abrahams, J. P., Leslie, A. G.W. , Lutter, R. , and Walker, J. E. 1994. Structure at 2.8 Å⁰ resolution of F₁ ATPase from bovine heart mitochondria. Nature 370: 621-628.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. Energy conversion : Mitochondria and chloroplast. Molecular biology of The Cell. 4th. New York: Garland Science: 767- 829.

Avers, C. J. 1986. Molecular Cell Biology. California: Benjamin/Cummings Publishing: 305-362.

Bertina, R. M., and Slater, E. C. 1975. The effect of phosphate and electron transport on the carbonyl cyanide m - chlorophenylhydrazone - induced ATPase of rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Acta. 376: 492-504.

Boyer , P. D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, PI, Racker, E., and Slater, E. E. 1977. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 46: 968-1000.

Boyer, P. D. 1997. The ATP synthase - A splendid molecular machine. Ann. Rev. Biochem. 66: 717-749.

- Cambell, M. K. 1995. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry. 3rd ed. New York: Wiley-Liss : 391-417.
- Chance, E., and Williams, G. R. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymology. 17: 65-134.
- Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S., and Chakraborti, S. 1999. Oxidant, mitochondria and calcium: An overview. Cell. Signal. 11(2): 77-85.
- Danishefsky, I. 1980. Biochemistry for medical sciences. 1st ed. Boston: Little Brown and Company.
- De Robertis, E.D.P., and De Robertis, E.M.F. 1987. Cell and molecular biology. 18th ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Devin, M. T., eds. 1997. Bioenergetics and oxidative metabolism. Textbook of Biochemistry with Clinical correlation. New York: Wiley-Liss: 237-289.
- Erecinska, M. , and Wilson, D. F., eds. 1981. Uncouplers of oxidative phosphorylation. Inhibitors of mitochondrial functions. Oxford: Pergamon Press : 199-210.
- Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Sun, X., and Schindler, P. A. 1996. The mitochondrial K_{ATP} channel as a receptor for potassium channel opener. The Journal of Biological Chemistry. 271: 8796-8799.
- Garrett, R. H., and Grisham, C. M. 2002. Electron transport and oxidative phosphorylation. Principles of Biochemistry with a Human Focus. Philadelphia: Harcourt College: 519-551.
- Fiske, O. H., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66: 375-400.
- Hansch, C., Sammes, P. G., and Taylor, eds. 1990. Comprehensive medicinal chemistry. 6 vols. 1st ed. Oxford: Pergamon Press: 705-779.

- Hanstein, W. G. 1976. Uncoupling of oxidative phosphorylation. Biochem.Biophys.Acta. 456: 129-148.
- Harper, H. A., Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., and Ridwell, V. W. 2000. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Harper's Biochemistry. 25th. Standford: Appleton & Lange : 137-148.
- Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Ann. Rev.Biochem. 54: 1015-1069.
- Haugaard, N., Lee, N. H., Kostrzewa, R., Horm, R. S., and Haugard, E. S.1969. The role of sulhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. Biochem Biophys. Acta. 172: 198 - 204.
- Hodgson, E. , and Smart, R. C. 2001. Effects of toxicants on electron transport and oxidative phosphorylation. Introduction to biochemical toxicology. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons: 309-324.
- Hogboom, G. H. 1955. Fractionation of Cell components of animal tissues. In S.P. Colowick, and N.O. Kaplan (eds) , Methods in enzymology. Vol. I. New York: Academic Press: 16-19.
- Karp, G. 2002. Aerobic respiration and the mitochondrion. Celland Molecular Biology Concepts and Experiments. 3rd ed. New York: Jonh Wiley & Sons: 183-217.
- Lehninger, A. L. 1970. Mitochondria and calcium ion transport. Biochem J. 119: 129-138.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. , and Cox , M. M. 2000. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Principles of Biochemistry. 3rd ed . New york: Worth Publishers: 659-721.
- Lowry, O. H., Roseveoufh, N. J., Farr, A. L., and Randal, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- Mathews, C. K., and Holde, K.E.V. 1990. Biological oxidations, electron transport, and oxidative phosphorylation. Biochemistry. California: Benjamin/Cummings Publishing: 504-537.
- Messerli, F. H. 1996. Cardiovascular Drug Therapy. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders: 1638-1645.
- Miccadei, S., and Floridi, A. 1993. Site of inhibition of mitochondrial electron transport by cadmium. Chemico Biological Interactions. 89: 159-167.
- Miller, G. L. 1959. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem. 31: 964.
- Mitchell, P. 1961. On the chemiosmotic theory of coupling. Nature. 144: 191-195.
- Myers, D. K., and Slater, E. C. 1957. The enzyme hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondria I. Activities at different pH values. Biochem. J. 67: 558-572.
- Szewczyk, A., and Wojtczak, L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. Pharmacol Rev 54 : 101-127.
- Scott, A. E., Cosma, G. N., Frank, A. A., Wells, R. L., and Gardner, H. S., Jr. 2001. Disruption of Mitochondrial Respiration by Melatonin in MCF-7 Cells. Toxicology and Applied Pharmacology. 171: 149-156.
- Senior, A. E. 1973. The structure of mitochondrial ATPase. Biochem Biophys. Acta. 301: 249-277.
- Sordahl, L. A., Johnson, C., Blailock, Z. R., and Schwartz, A. 1971. The mitochondria. Methods in pharmacology. New York: Meredith Corporation: 247-250.
- Tatiya Thanomdee. 2002. Effects of Acyaminopyridine derivatives and acylaniline derivatives on Monoamine oxidase activity in isolated rat liver mitochondria. Master ' thesis, Department of Pharmaceutical Science, Graduate School, Chulalongkorn University.
- Voet, D., Voet, J. G. , and Pratt, C. W. 1999. Electron transport and oxidative phosphorylation. Fundamentals of Biochemistry. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons: 492-528.

Wallace, K. B., and Starkov, A. A. 2000. Mitochondrial targets of drug toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 353-388.

Weinbach, E. C. 1956. Pentachlorophenol and mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol.Chem. 221: 609-618.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวหทัยรัตน์ เชื้อนเสน เกิดเมื่อวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดลำปาง สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีเกศาสตรบัณฑิตจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2543 ปัจจุบันรับราชการตำแหน่งเภสัชกร ระดับ 4 กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลพิจิตร จังหวัดพิจิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย