บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผลของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนูขาว

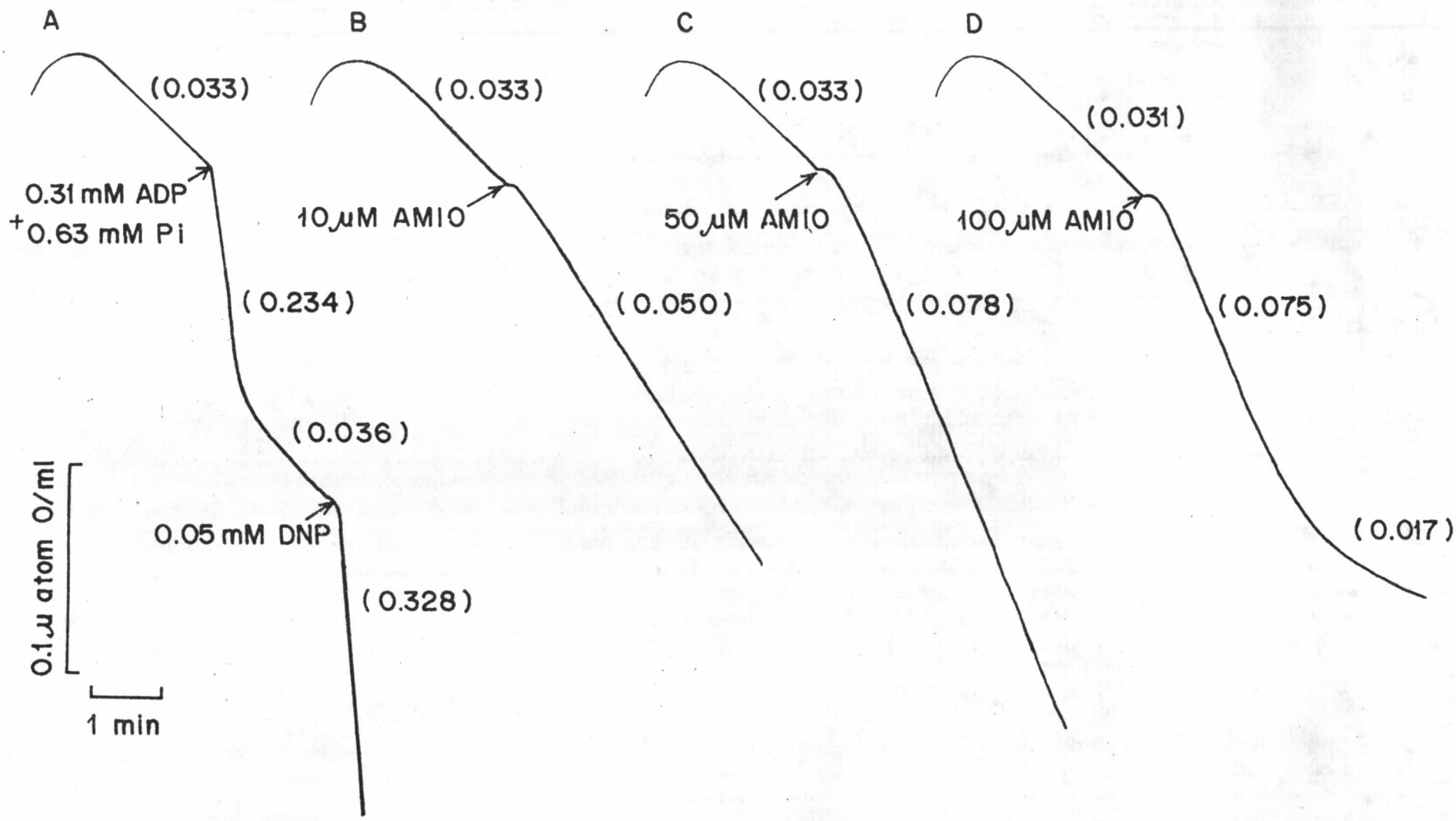
1. ผลของ amiodarone ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 14 A แสดงถึง control respiratory response ตามปกติของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ตัวเลขที่กำกับอยู่ที่ระยะต่าง ๆ ของการหายใจของไมโตคอนเดรียคือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะ (states) ต่าง ๆ คำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ในระยะแรกของรูปที่ 14 A ส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยา มีเพียงไมโตคอนเดรียที่ถูก incubate อยู่ใน incubation medium ที่มี glutamate + malate เป็นสับสเตรทอยู่ในปริมาณที่มากเกินพอที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้จะต่ำ (0.033) เรียกระยะนี้ว่า state 4 respiration (ซึ่งจะมีเพียงไมโตคอนเดรีย, ออกซิเจน และสับสเตรท) เมื่อเติม ADP + Pi ลงไป จะเร่งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียให้สูงขึ้น (0.234) เรียกระยะนี้ว่า state 3 respiration จนกระทั่ง ADP ถูกใช้หมดไปในการทำปฏิกิริยาคือ มีการสร้าง ATP จาก ADP และ Pi หลังจากนั้น อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะช้าลง (0.036) คือ กลับสู่ state 4 respiration อีกครั้ง (tracing cut off) และการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP เรียกว่า ไมโตคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโตคอนเดรีย และสามารถใช้ค่า respiratory control index (RCI) เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly coupled mitochondria หรือไม่ ซึ่งค่า RCI นี้จะคำนวณได้จากอัตราส่วนของอัตราการหายใจใน state 3/อัตราการหายใจใน state 4 จากรูปที่ 14 A ค่า RCI มีค่าเท่ากับ 0.234/0.036 = 6.5 และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler จะทำให้การควบคุมการหายใจนี้เสียไป โดยที่ DNP สามารถกระตุ้นการหายใจหรือการใช้ออกซิเจนได้มาก (0.328) คล้ายกับ state 3 respiration แม้ว่าไม่มี ADP

รูปที่ 14 ผลของ amiodarone ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการหายใจของไมโต-คอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.57 มก.โปรตีน/มล. ปริมาณของ amiodarone ในขนาดต่าง ๆ ที่เติมตามลงไปดังแสดงในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

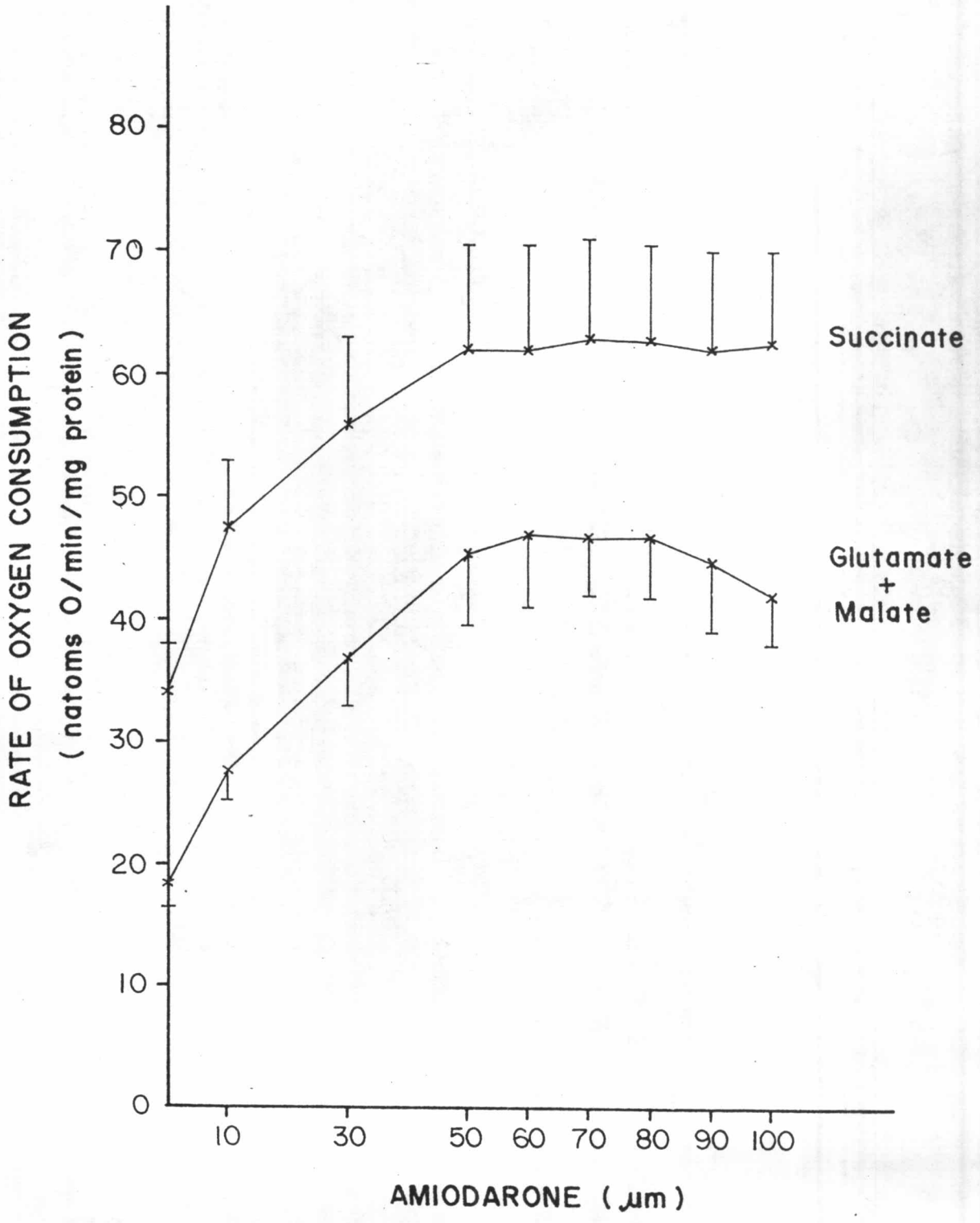
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
B
C
D
(0.033)
(0.033)
(0.033)
(0.031)
0.31 mM ADP
+0.63 mM Pi
10 μM AMIO
50 μM AMIO
100 μM AMIO
(0.234)
(0.050)
(0.078)
(0.075)
(0.036)
0.05 mM DNP
(0.328)
(0.017)
0.1 μ atom O/ml
1 min

รูปที่ 15 Dose-response curve ของ amiodarone ที่มีต่อ state 4 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate หรือ 5.24 mM succinate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.63 มก.โปรตีน/มล. ปริมาณของ amiodarone ในขนาดต่าง ๆ ที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

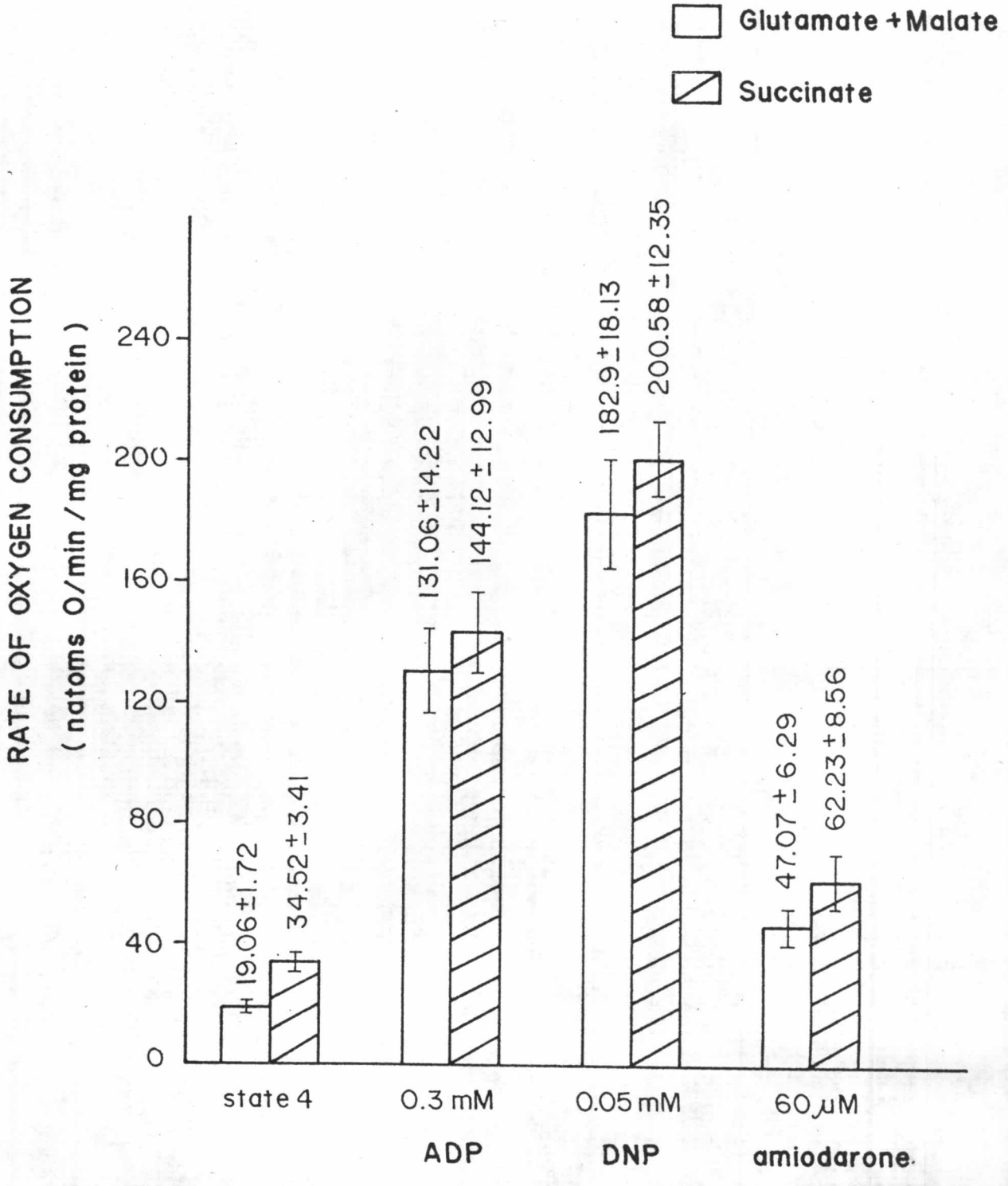
แต่ละจุดที่แสดง แทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง


RATE OF OXYGEN CONSUMPTION
(natoms O/min/mg protein)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
30
50
60
70
80
90
100
AMIODARONE (µm)
Succinate
Glutamate
+
Malate

รูปที่ 16 ผลเปรียบเทียบการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดย amiodarone, ADP และ DNP เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate + 5.24 mM potassium malate หรือ 5.24 mM potassium succinate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.63 มก.โปรตีน/มล. ปริมาณของ ADP, DNP และ amiodarone ที่เติมตามลงไปกระตุ้นการหายใจดังแสดงในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดง แทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง


Glutamate + Malate
Succinate
RATE OF OXYGEN CONSUMPTION
(natoms O/min / mg protein)
240
200
160
120
80
40
0
19.06 ± 1.72
34.52 ± 3.41
131.06 ± 14.22
144.12 ± 12.99
182.9 ± 18.13
200.58 ± 12.35
47.07 ± 6.29
62.23 ± 8.56
state 4
0.3 mM ADP
0.05 mM DNP
60 μM amiodarone

ตารางที่ 3 ผลของ amiodarone ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate หรือ 5.24 mM potassium succinate, 13.09 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.63 มก.โปรตีน/มล. เติมเอทธานอล หรือ amiodarone ในขนาดต่าง ๆ ลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรีย เป็นเวลา 1 นาทีก่อนที่จะเติม ADP + Pi ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

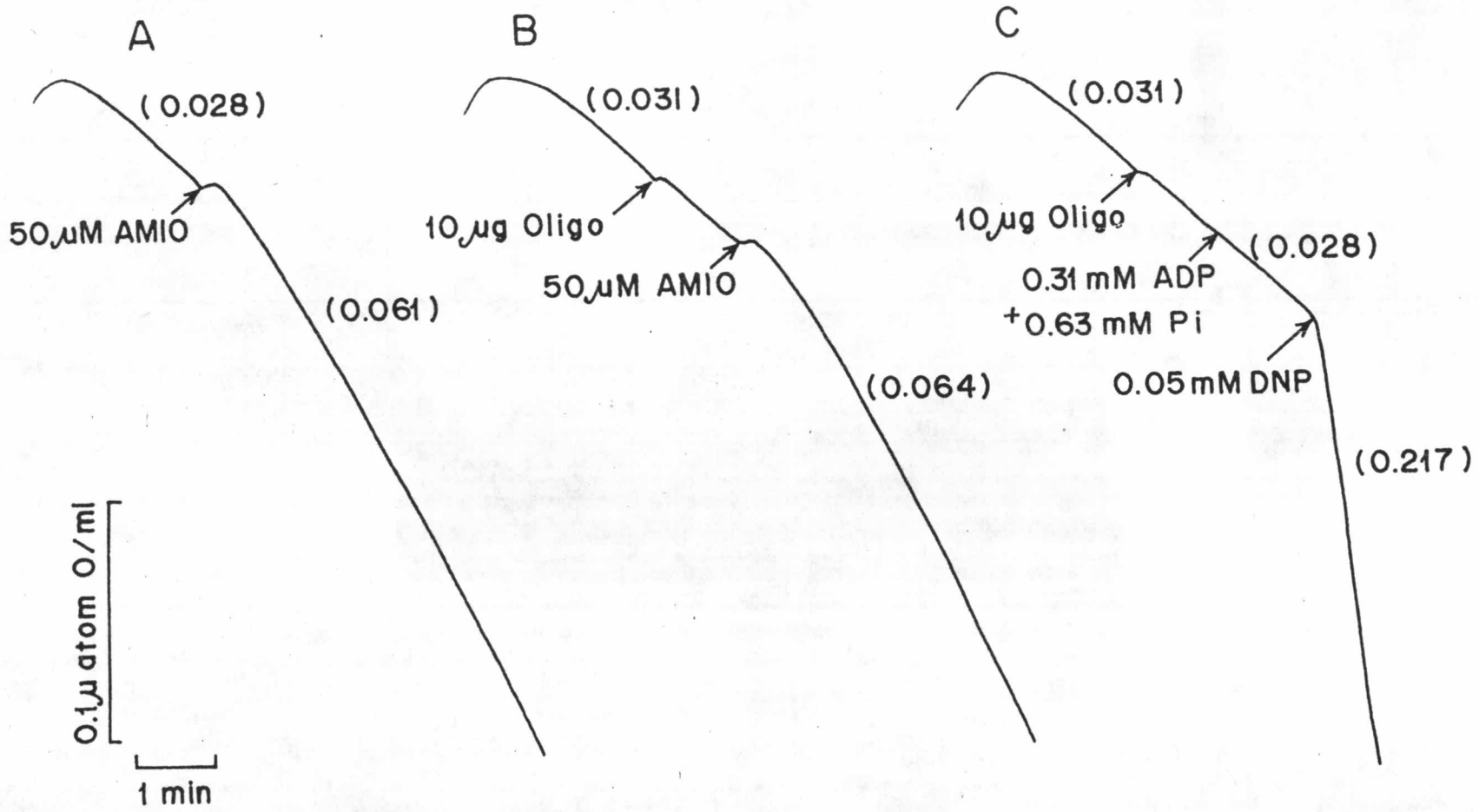
Experiments	glutamate + malate		succinate	
	RCI	P/O	RCI	P/O
control (5 µl ethanol)	5.76 ± 0.25	3.16 ± 0.09	3.93 ± 0.08	2.17 ± 0.07
20 µM amiodarone	3.20 ± 0.06*	2.66 ± 0.13*	2.48 ± 0.16*	1.64 ± 0.08*
50 µM amiodarone	2.01 ± 0.14*	2.15 ± 0.09*	1.55 ± 0.13*	1.46 ± 0.05*

* $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 17 ผลของ oligomycin ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate, 13.09 mM succinate, และไมโตคอนเดรีย 1.52 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ amiodarone, oligomycin และ ADP + Pi ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

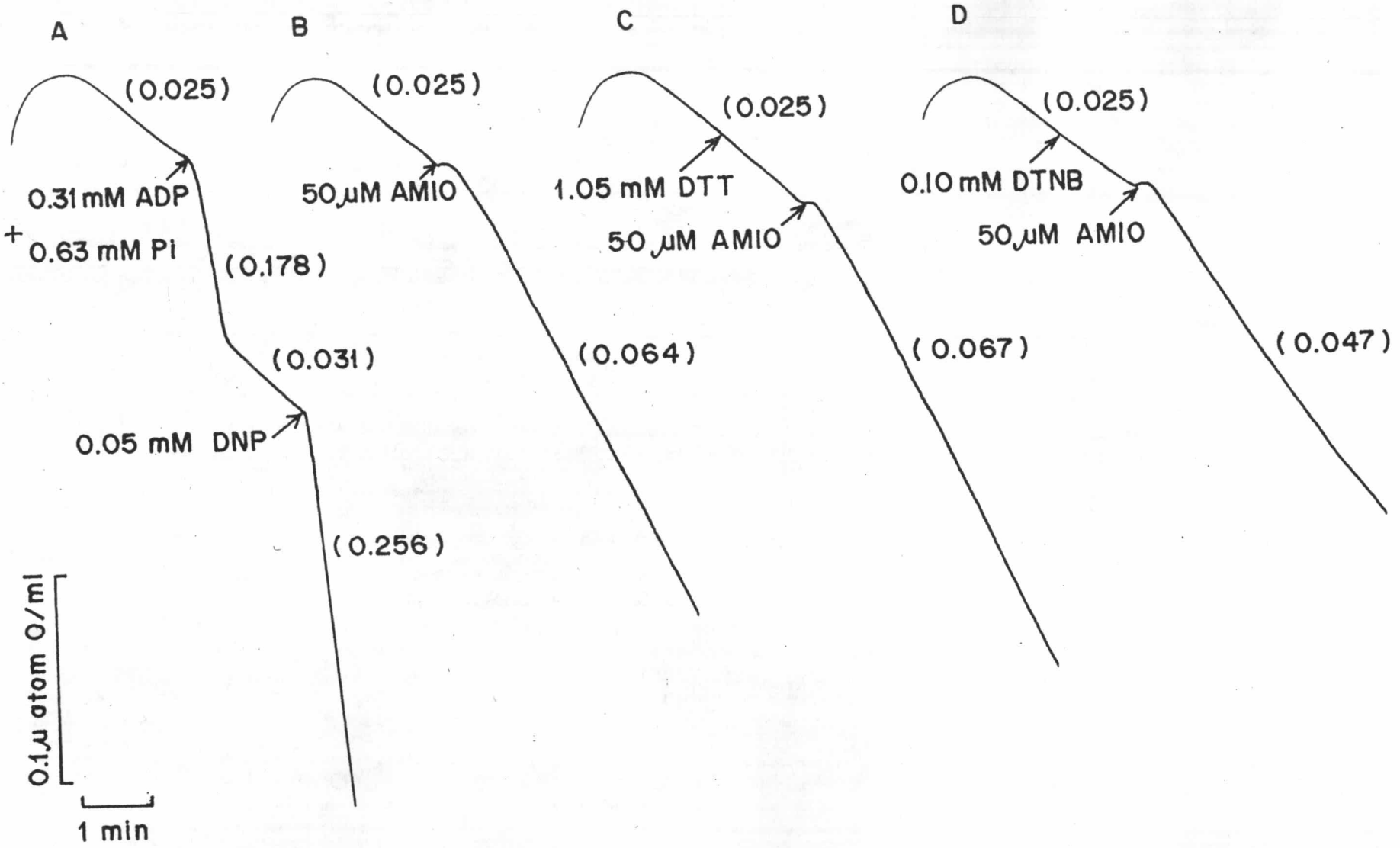
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
(0.028)
50 μM AMIO
(0.061)
B
(0.031)
10 μg Oligo
50 μM AMIO
(0.064)
C
(0.031)
10 μg Oligo
0.31 mM ADP
+0.63 mM Pi
(0.028)
0.05 mM DNP
(0.217)
0.1 μ atom O/ml
1 min

รูปที่ 18 ผลของ DTT และ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.46 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP + Pi, DNP, DTT, DTNB และ amiodarone ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
B
C
D
(0.025)
(0.025)
(0.025)
(0.025)
0.31 mM ADP
+
0.63 mM Pi
50 μM AMIO
1.05 mM DTT
50 μM AMIO
0.10 mM DTNB
50 μM AMIO
(0.178)
(0.031)
(0.064)
(0.067)
(0.047)
0.05 mM DNP
(0.256)
0.1 μ atom O/ml
1 min

ตารางที่ 4 ผลของ amiodarone ต่อ state 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate, succinate และ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate หรือ 5.24 mM potassium succinate หรือ 2.09 mM ascorbate และ 0.52 mM TMPD, 0.05 mM DNP, 13.09 mM sucrose, และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.52 มก.โปรตีน/มล. เติม amiodarone ลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 5 นาทีก่อนที่จะเติม DNP ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

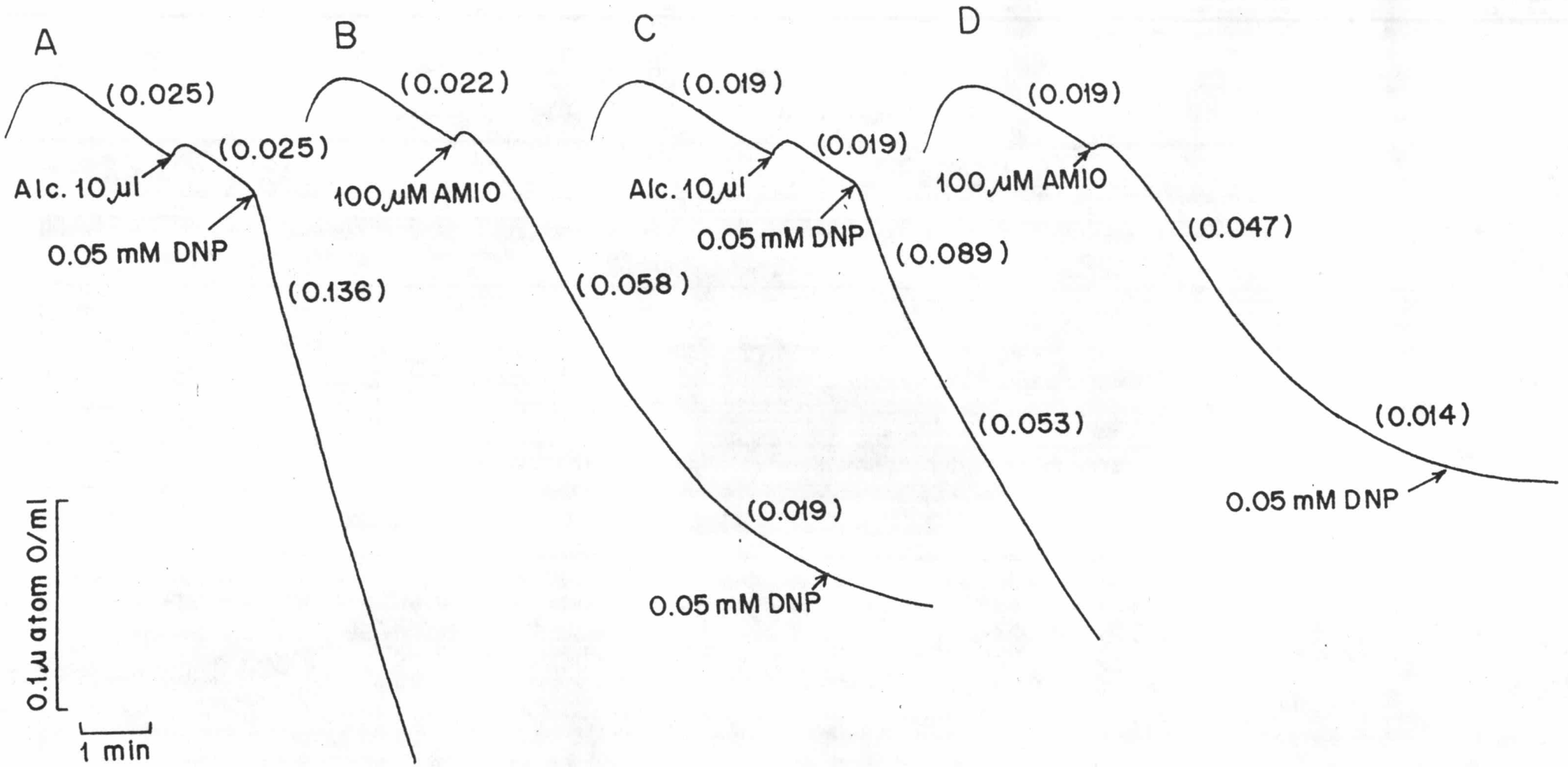
substrates	rate of state 3u respiration (μatom O/min/mg protein)	
	control	100 μM amiodarone
glutamate + malate	0.188 ± 0.026	0.007 ± 0.001*
succinate	0.249 ± 0.033	0.043 ± 0.003*
ascorbate + TMPD	0.283 ± 0.032	0.258 ± 0.028

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 19 ผลของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ β-hydroxybutyrate หรือ pyruvate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM β-hydroxybutyrate (curves A และ B) หรือ 5.24 mM pyruvate (curves C และ D), 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.73 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ เอทธานอล DNP และ amiodarone ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

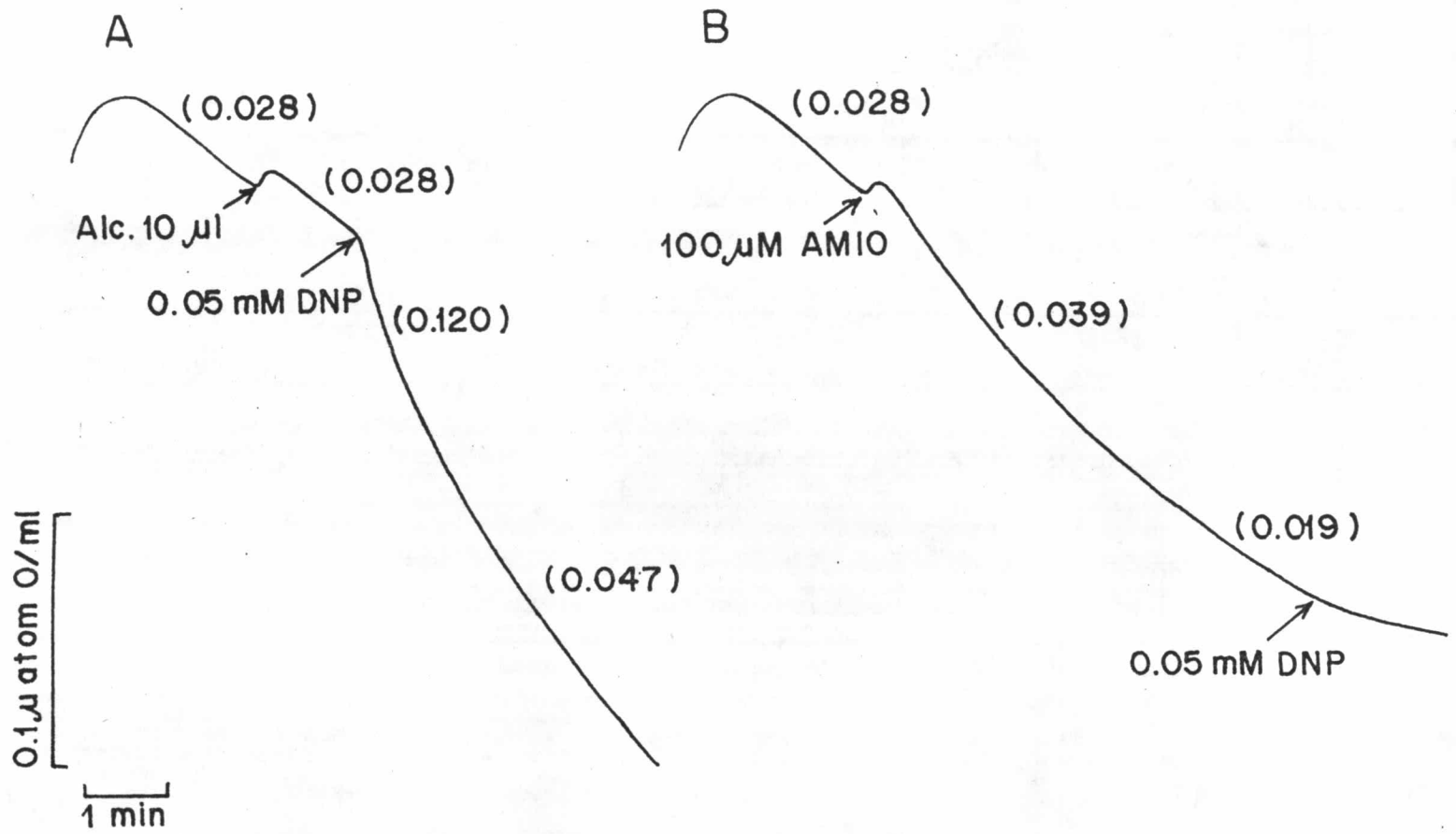
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
B
C
D
(0.025)
(0.025)
Alc. 10 µl
0.05 mM DNP
(0.136)
(0.022)
100 µM AMIO
(0.058)
(0.019)
(0.019)
Alc. 10 µl
0.05 mM DNP
(0.089)
(0.053)
(0.019)
0.05 mM DNP
(0.019)
100 µM AMIO
(0.047)
(0.014)
0.05 mM DNP
0.1 µ atom O/ml
1 min

รูปที่ 20 ผลของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ α-ketoglutarate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM α-ketoglutarate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.73 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ เอทธานอล, DNP และ amiodarone ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
(0.028)
(0.028)
Alc. 10 µl
0.05 mM DNP
(0.120)
(0.047)
0.1 µ atom O/ml
1 min
B
(0.028)
100 µM AMIO
(0.039)
(0.019)
0.05 mM DNP

ตารางที่ 5 ผลของ amiodarone และ DNP ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโต-คอนเดรีย เมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 2.09 mM ascorbate และ 0.52 mM TMPD, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.63 มก.โปรตีน/มล. เติม DNP หรือ amiodarone ลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 2 นาที ก่อนที่จะเติม ascorbate + TMPD ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

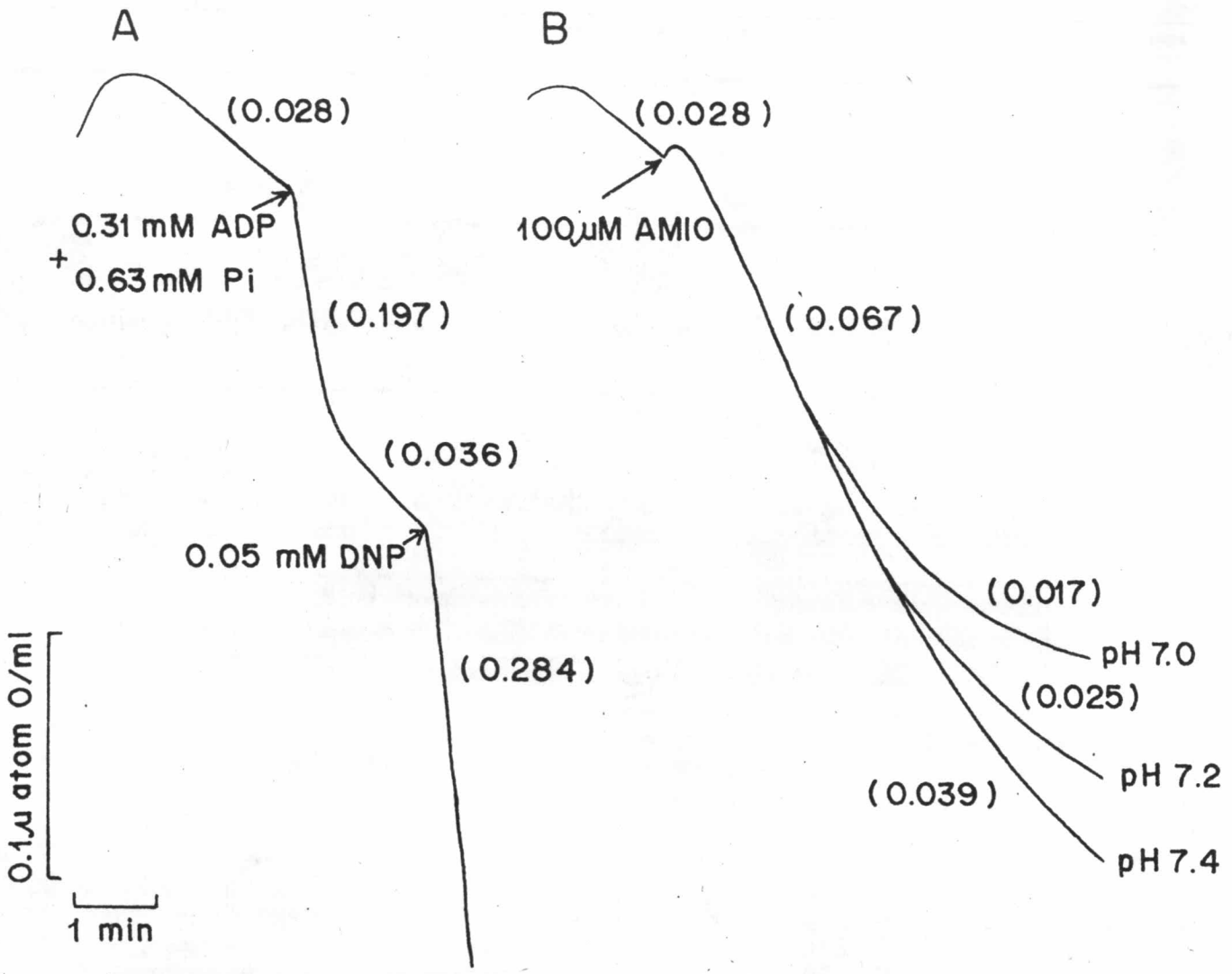
Experiments	rate of oxygen consumption (μatom O/min/mg protein)
control	0.156 ± 0.010
0.05 mM DNP	0.242 ± 0.017*
100 μM amiodarone	0.210 ± 0.018*

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 21 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.0, pH 7.2 และ pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.57 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ amiodarone, ADP + Pi และ DNP ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

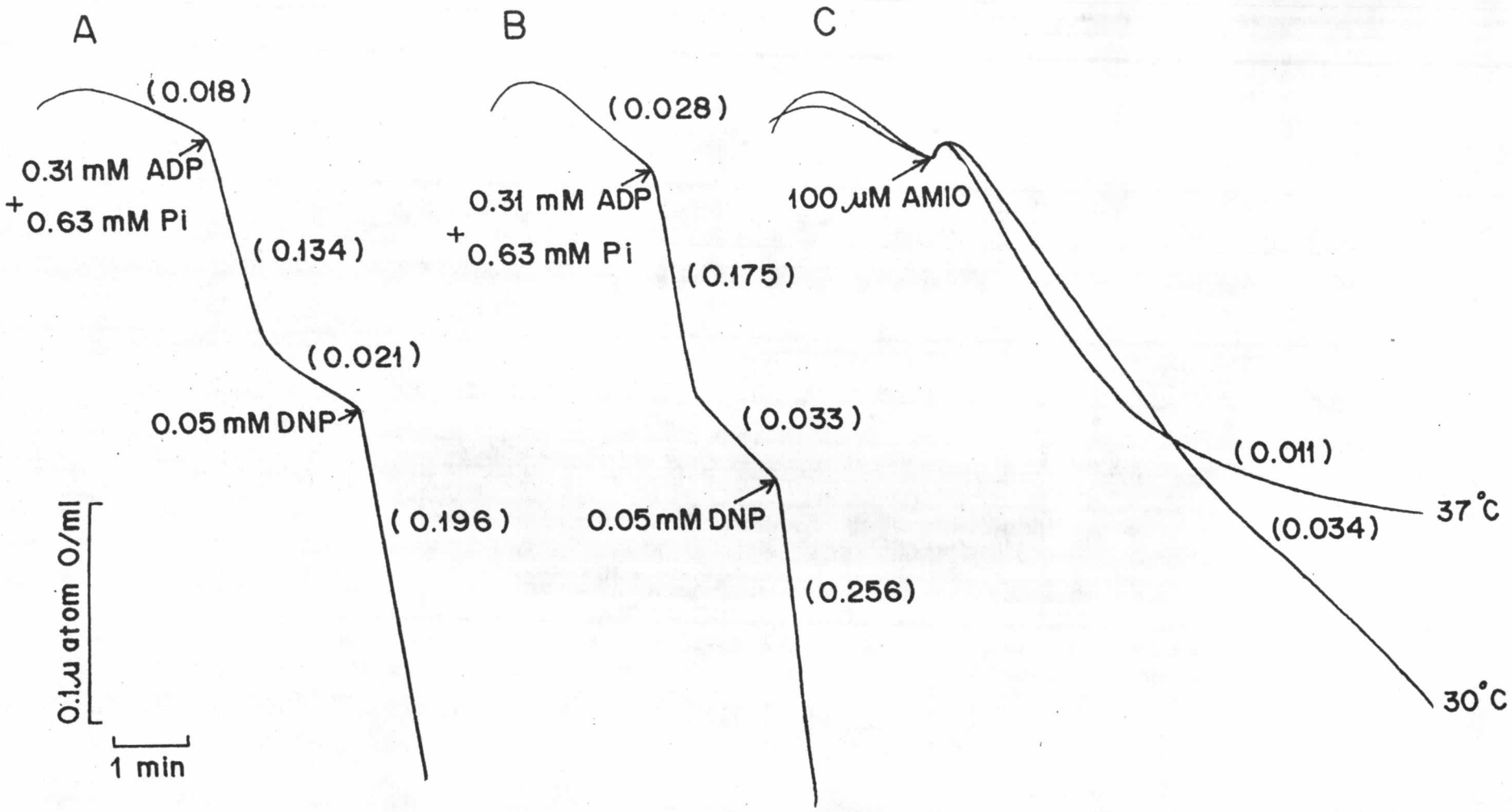
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
(0.028)
0.31 mM ADP
+
0.63 mM Pi
(0.197)
(0.036)
0.05 mM DNP
(0.284)
0.1 μ atom O/ml
1 min
B
(0.028)
100 μM AMIO
(0.067)
(0.017)
pH 7.0
(0.025)
pH 7.2
(0.039)
pH 7.4

รูปที่ 22 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.54 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ ADP + Pi, DNP และ amiodarone ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 30°C หรือ 37°C

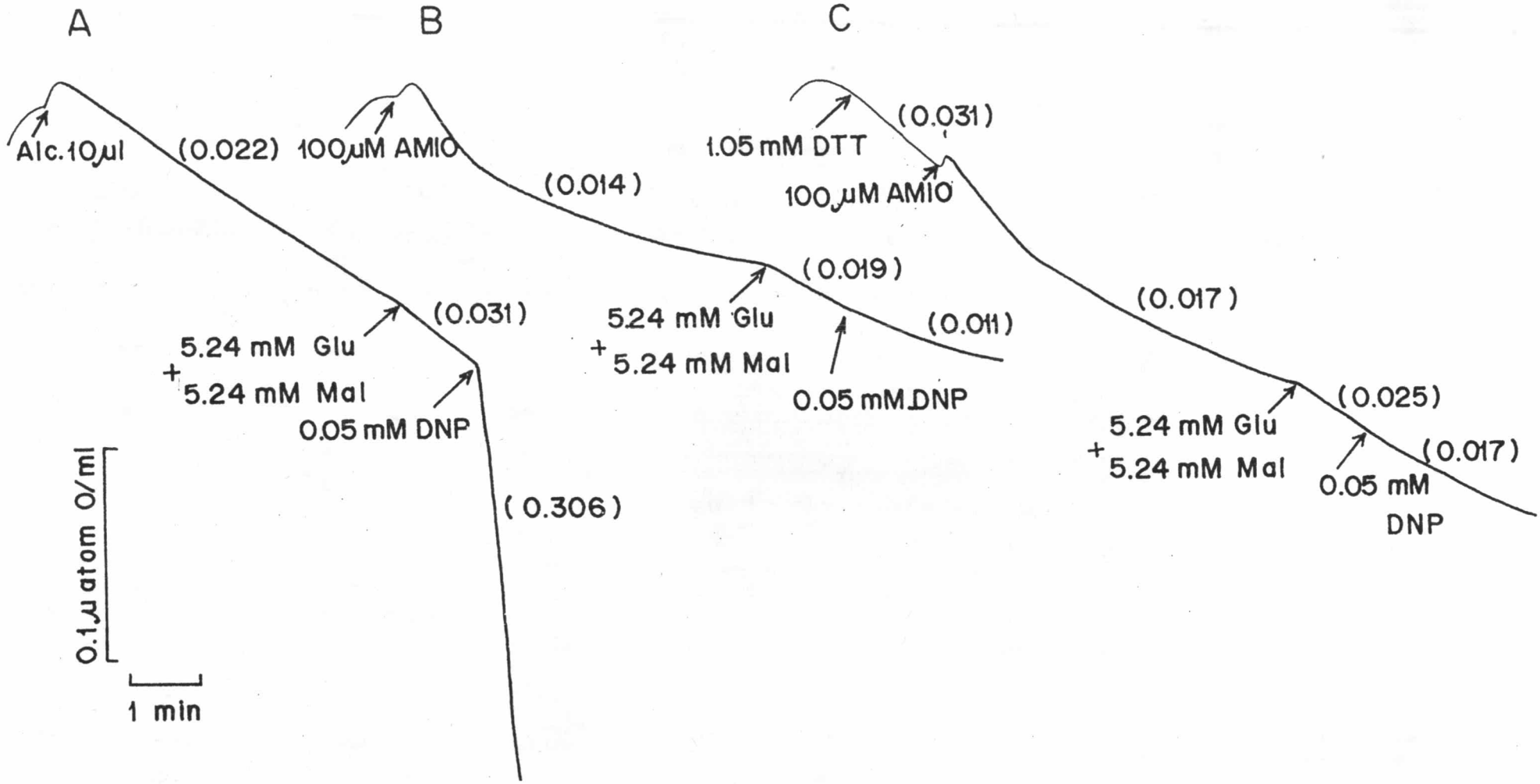
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
(0.018)
0.31 mM ADP
+
0.63 mM Pi
(0.134)
(0.021)
0.05 mM DNP
(0.196)
0.1 μ atom O/ml
1 min
B
(0.028)
0.31 mM ADP
+
0.63 mM Pi
(0.175)
(0.033)
0.05 mM DNP
(0.256)
C
100 μM AMIO
(0.011)
37°C
(0.034)
30°C

รูปที่ 23 ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.73 มก.โปรตีน/มล. เติมเอทธานอล หรือ amiodarone ลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะเติมสับสเตรท ส่วน DTT จะเติมก่อน amiodarone 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

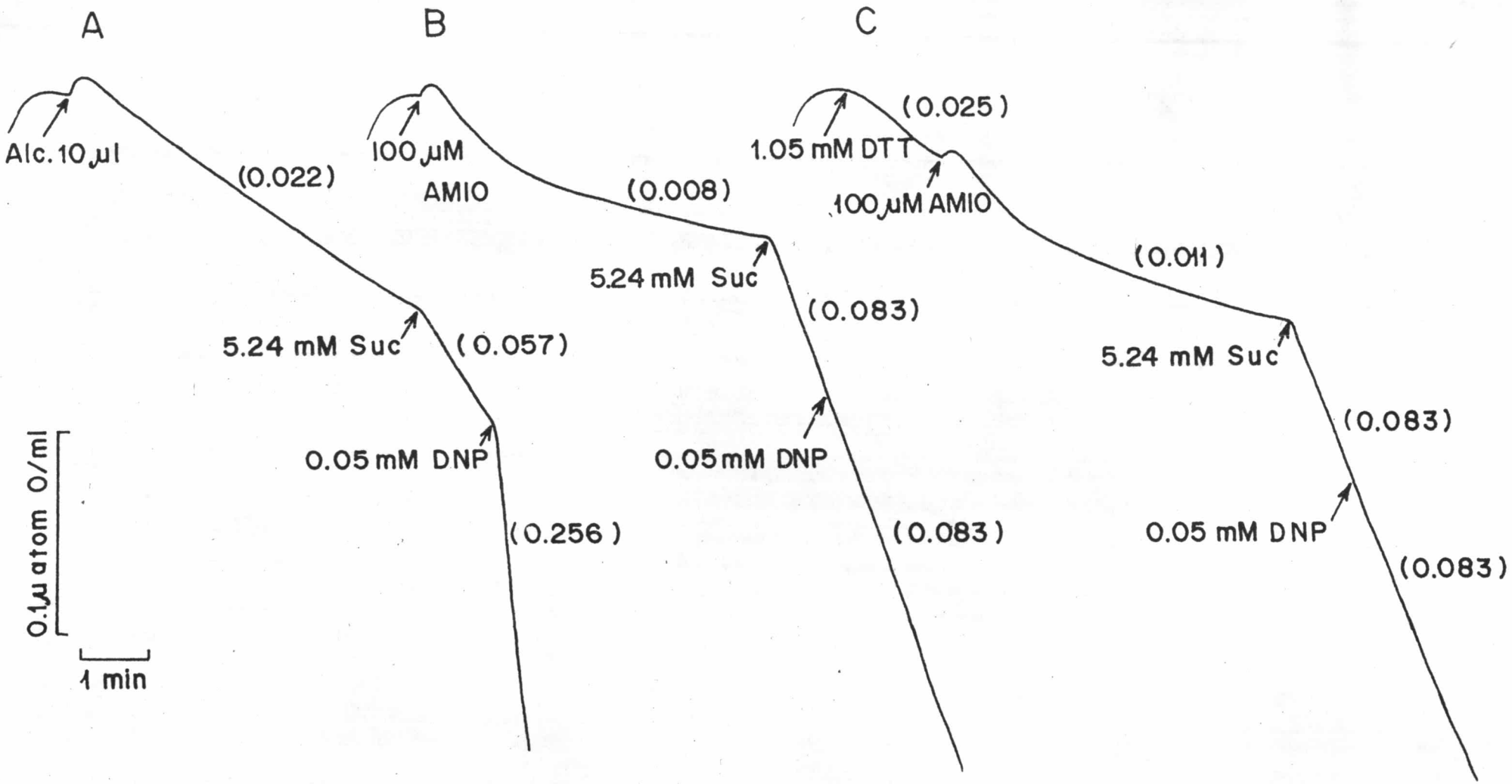
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
B
C
Alc. 10µl
(0.022)
100µM AMIO
(0.014)
1.05 mM DTT
(0.031)
100µM AMIO
(0.019)
(0.017)
5.24 mM Glu
+
5.24 mM Mal
(0.031)
0.05 mM DNP
(0.306)
5.24 mM Glu
+
5.24 mM Mal
(0.011)
0.05 mM DNP
5.24 mM Glu
+
5.24 mM Mal
(0.025)
0.05 mM
DNP
(0.017)
0.1µatom O/ml
1 min

รูปที่ 24 ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium succinate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.73 มก.โปรตีน/มล. เติมเอทธานอล หรือ amiodarone ลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะเติมสับสเตรท ส่วน DTT จะเติมก่อน amiodarone 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
B
C
Alc. 10 µl
(0.022)
5.24 mM Suc
(0.057)
0.05 mM DNP
(0.256)
100 µM AMIO
(0.008)
5.24 mM Suc
(0.083)
0.05 mM DNP
(0.083)
1.05 mM DTT
(0.025)
100 µM AMIO
(0.011)
5.24 mM Suc
(0.083)
0.05 mM DNP
(0.083)
0.1 µ atom O/ml
1 min

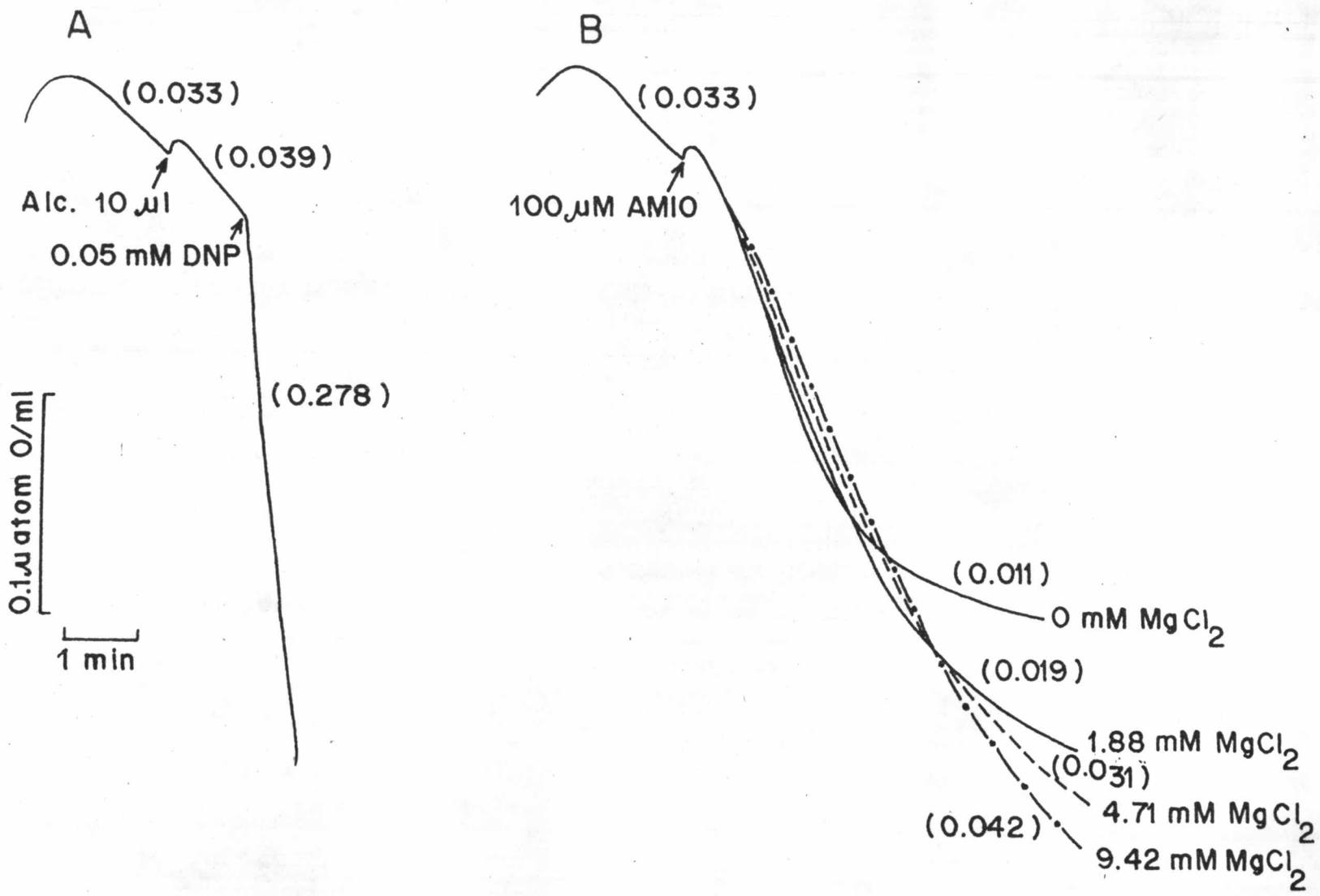
รูปที่ 25 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Mg^{2+} ใน incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.73 มก.โปรตีน/มล. ปริมาณของ $MgCl_2$ และ KCl ใน incubation medium คือ

0	mM $MgCl_2$	และ	89.53 mM KCl	หรือ
1.88	mM $MgCl_2$	และ	86.70 mM KCl	หรือ
4.71	mM $MgCl_2$	และ	82.89 mM KCl	หรือ
9.42	mM $MgCl_2$	และ	75.79 mM KCl	

ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ เอทธานอล, DNP และ amiodarone ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

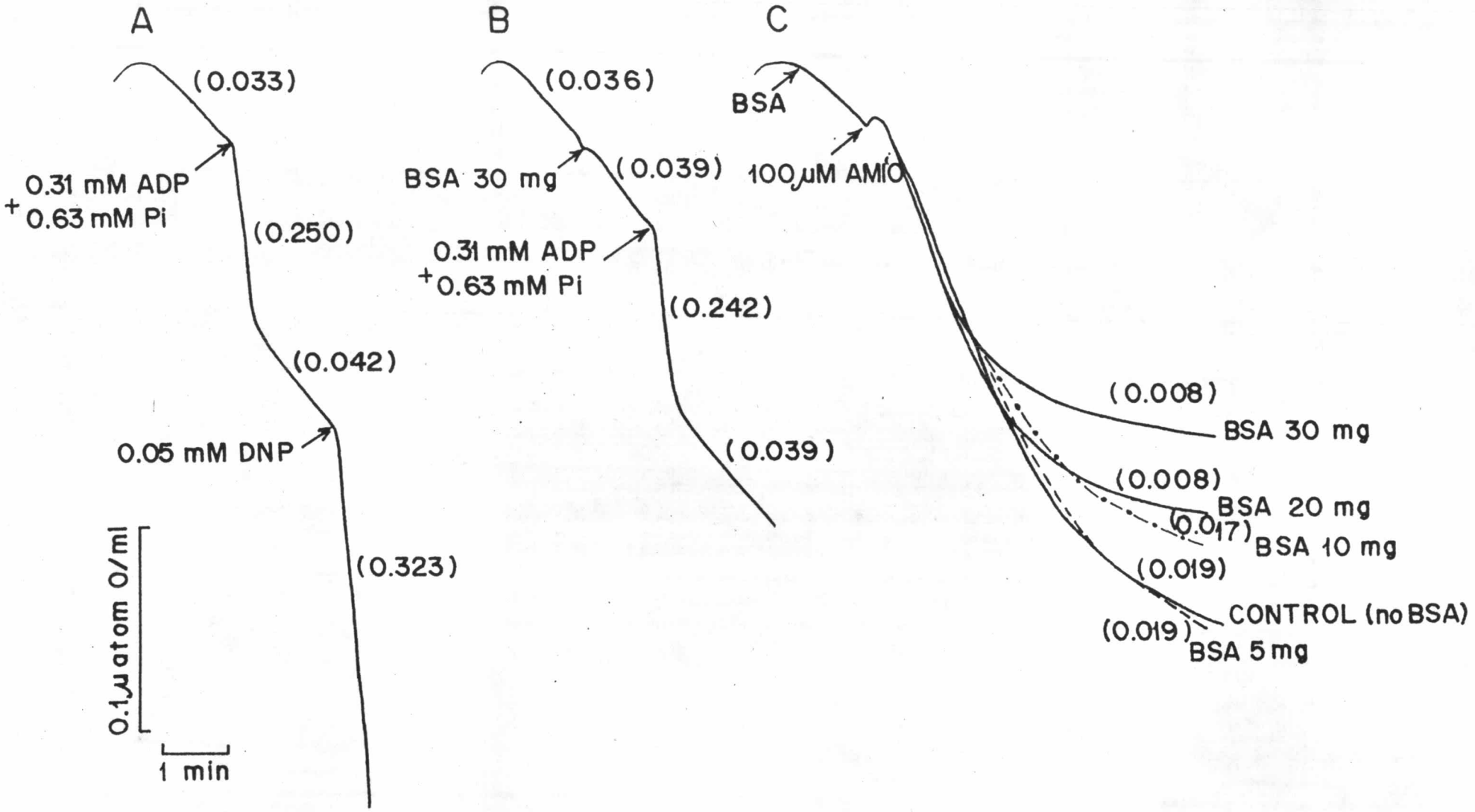
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
(0.033)
(0.039)
Alc. 10 µl
0.05 mM DNP
(0.278)
0.1µatom O/ml
1 min
B
(0.033)
100µM AMIO
(0.011)
0 mM MgCl2
(0.019)
1.88 mM MgCl2
(0.031)
4.71 mM MgCl2
(0.042)
9.42 mM MgCl2

รูปที่ 26 ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate, 13.09 mM sucrose, ไมโตคอนเดรีย 1.23 มก.โปรตีน/มล. (curves A และ C) และ 2.16 มก.โปรตีน/มล. (curve B) ส่วนประกอบที่เติมลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP + Pi, DNP, BSA และ amiodarone ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
(0.033)
0.31 mM ADP
+0.63 mM Pi
(0.250)
(0.042)
0.05 mM DNP
(0.323)
0.1 μatom O/ml
1 min
B
(0.036)
BSA 30 mg
(0.039)
0.31 mM ADP
+0.63 mM Pi
(0.242)
(0.039)
C
BSA
100 μM AMO
(0.008)
BSA 30 mg
(0.008)
BSA 20 mg
(0.017)
BSA 10 mg
(0.019)
CONTROL (no BSA)
(0.019)
BSA 5 mg

ตารางที่ 6 ผลของ amiodarone เปรียบเทียบกับผลของ DNP ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 33.85 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.69 mM $MgCl_2$, 77.85 mM KCl, 25.64 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.31 มก. โปรตีน/มล. เอทธานอล, amiodarone, DNP และ oligomycin ดังแสดงในตาราง, 5.00 mM ATP, ปริมาตรทั้งหมด 1.95 มล. อุณหภูมิ 37°C เติมตัวยาต่าง ๆ ลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรียตามลำดับ ดังแสดงในตาราง การเติมตัวยาแต่ละครั้งเว้นเวลา 1 นาที เติม ATP หลังจากเติมตัวยาต่าง ๆ ครบแล้วเป็นเวลา 2 นาที

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

Additions	Pi liberated (μmoles/mg protein/10 min)
none	0.86 ± 0.05
10 μl ethanol	0.92 ± 0.03
100 μM amiodarone	1.55 ± 0.12[a]
100 μM amiodarone + 10 μg oligomycin	1.03 ± 0.03[b]
0.1 mM DNP	3.49 ± 0.10[c]
0.1 mM DNP + 10 μg oligomycin	1.02 ± 0.04[d]
0.1 mM DNP + 100 μM amiodarone	3.11 ± 0.10[e]

a ค่า $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ 10 μl ethanol

b ค่า $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 μM amiodarone

c ค่า $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ none

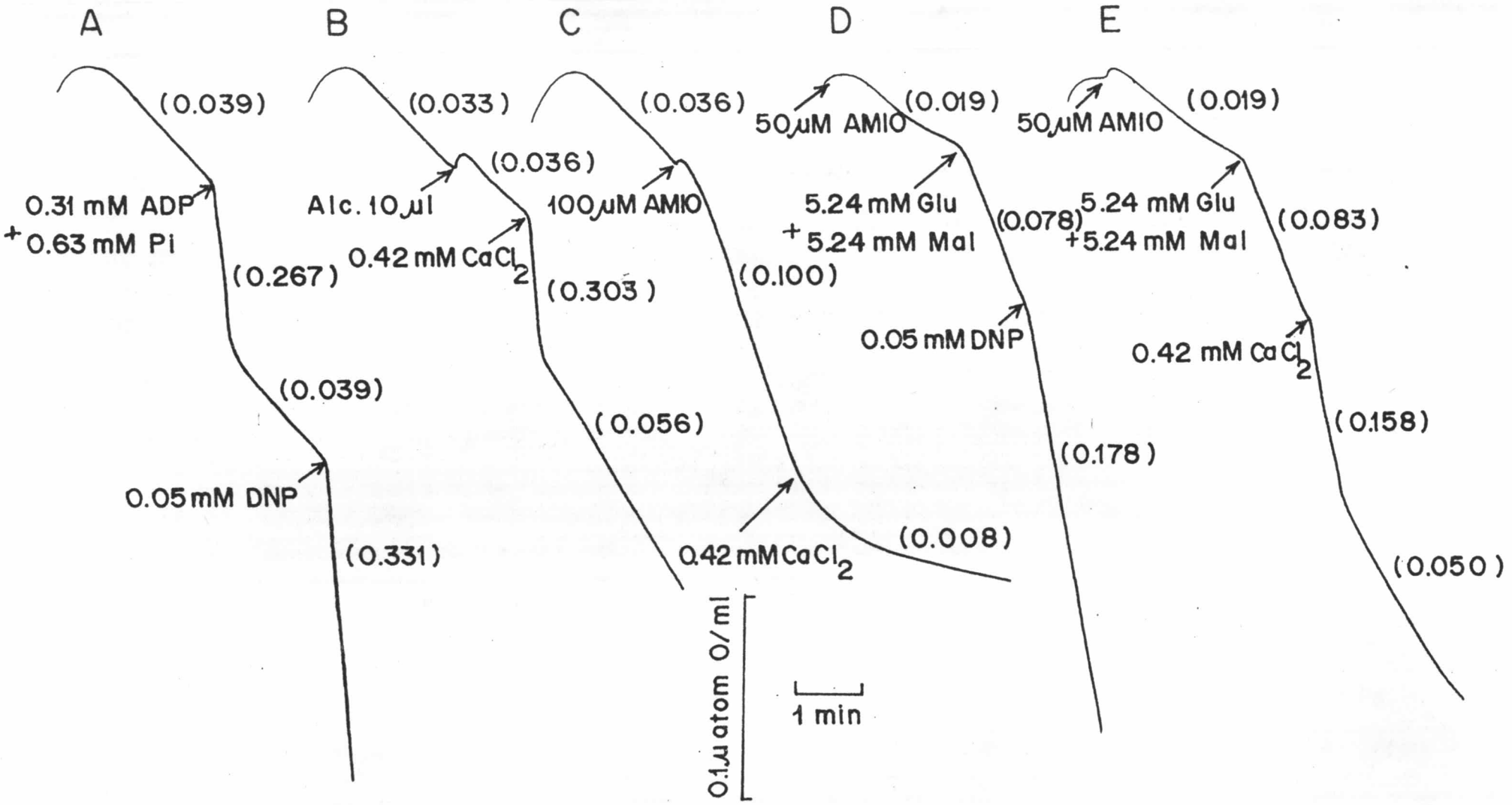
d ค่า $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1 mM DNP

e ค่า $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1 mM DNP

รูปที่ 27 ผลของ amiodarone ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.70 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.70 mM KCl, 0.47 mM Pi, 5.24 mM potassium glutamate และ 5.24 mM potassium malate, 13.09 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.53 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ ADP + Pi, DNP, เอทธานอล, $CaCl_2$ และ amiodarone ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

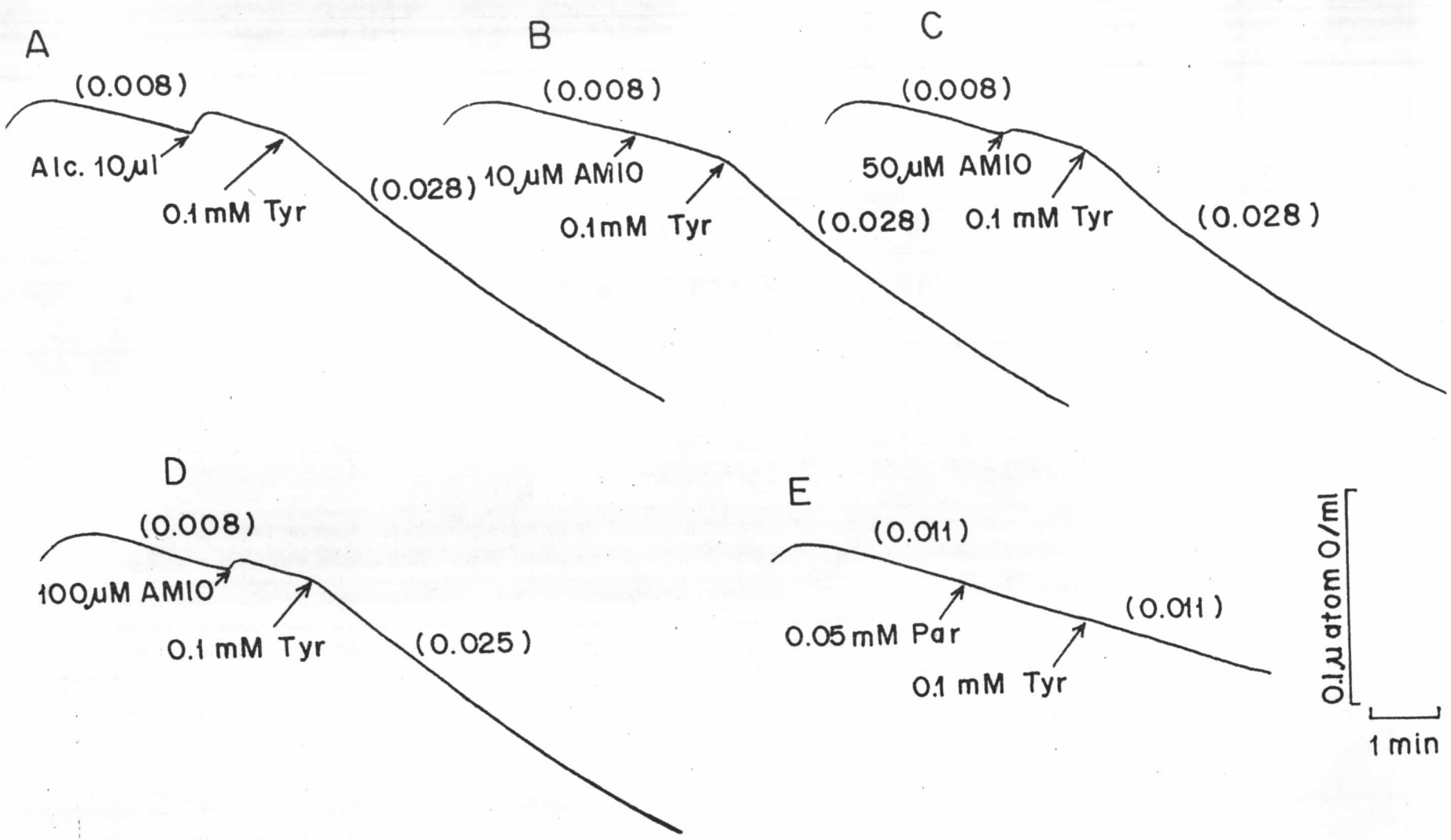
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
B
C
D
E
(0.039)
0.31 mM ADP
+0.63 mM Pi
(0.267)
(0.039)
0.05 mM DNP
(0.331)
(0.033)
Alc. 10 µl
(0.036)
0.42 mM CaCl2
(0.303)
(0.056)
(0.036)
100 µM AMIO
(0.100)
0.42 mM CaCl2
(0.008)
50 µM AMIO
(0.019)
5.24 mM Glu
+5.24 mM Mal
(0.078)
0.05 mM DNP
(0.178)
50 µM AMIO
(0.019)
5.24 mM Glu
+5.24 mM Mal
(0.083)
0.42 mM CaCl2
(0.158)
(0.050)
0.1 µ atom O/ml
1 min

รูปที่ 28 ผลของ amiodarone ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.023 M KH_2PO_4 pH 7.2, 13.09 mM sucrose, 10 μg rotenone และไมโตคอนเดรีย 1.45 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ เอทธานอล, tyramine, amiodarone และ pargyline ปริมาตรทั้งหมด 1.91 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที


A
(0.008)
Alc. 10µl
0.1 mM Tyr
(0.028)
B
(0.008)
10µM AMIO
0.1 mM Tyr
C
(0.008)
50µM AMIO
(0.028)
0.1 mM Tyr
(0.028)
D
(0.008)
100µM AMIO
0.1 mM Tyr
(0.025)
E
(0.011)
0.05 mM Par
0.1 mM Tyr
(0.011)
0.1µ atom O/ml
1 min

อยู่ก็ตาม เรียกระยะนี้ว่า state 3u respiration และจะมีการใช้ออกซิเจนติดต่อกันไปจนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ในที่สุด ($O_2 \approx 0$)

ในรูป 14 B, C, D แสดงให้เห็นว่า amiodarone สามารถกระตุ้นการหายใจใน state 4 respiration ของไมโตคอนเดรียได้ในลักษณะที่คล้ายกับ DNP คือ ในสภาวะที่ไม่มี ADP และสามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้มากขึ้นตามขนาดของสารที่ใช้ กล่าวคือ ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เพิ่มขึ้นเป็น 0.050 และ 0.078 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที เมื่อใช้ขนาดของ amiodarone เป็น 10 µM และ 50 µM ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบ amiodarone ในขนาด 50 และ 100 µM พบว่า จะกระตุ้นการหายใจใน state 4 ได้ไม่แตกต่างกัน และที่น่าสังเกตคือ amiodarone ในขนาด 100 µM นอกจากจะสามารถกระตุ้น state 4 respiration ในระยะแรก ๆ ได้แล้ว ยังมีลักษณะที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือ สามารถยับยั้ง state 4 respiration เมื่อเวลาผ่านไป ดังนั้น amiodarane ในขนาดสูง คือ 100 µM จะมีผลสองอย่างต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย คือ กระตุ้นการหายใจ (state 4 respiration) ในระยะแรก และต่อมาตามด้วยการยับยั้งการหายใจ ส่วนเอทธานอล เมื่อใช้ในปริมาณเท่ากับที่ใช้ละลายตัวยา (10 µl) ไม่มีผลกระตุ้น state 4 respiration อย่าง amiodarone (ไม่ได้แสดงไว้ในรูป)

ในรูปที่ 15 แสดง dose-response curves ของ amiodarone ขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท จะเห็นได้ว่า ทั้งสองกรณีได้ผลในลักษณะที่คล้ายกัน คือ เมื่อใช้ amiodarone ในขนาดที่สูงขึ้น จะเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ได้มากขึ้น และสูงสุดเมื่อมีปริมาณของ amiodarone 60 µM (กรณีของ glutamate + malate) และ 70 µM (กรณีของ succinate) และถ้าใช้ amiodarone ในปริมาณมากกว่านี้ กลับพบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration จะลดลงในกรณีของ glutamate + malate (แสดงว่า เริ่มมีการยับยั้งการหายใจ) และค่อนข้างคงที่ในกรณีของ succinate

2. ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์การกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดย amiodarone, ADP และ DNP

ในรูปที่ 16 amiodarone ขนาด 60 μM ซึ่งเป็นขนาดที่กระตุ้น state 4 respiration ของไมโตคอนเดรียได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการหายใจที่ถูกกระตุ้นโดย 0.3 mM ADP และ 0.05 mM DNP แล้ว จะเห็นว่า amiodarone สามารถกระตุ้นการหายใจได้ในอัตราที่ต่ำกว่าทั้ง ADP และ DNP มาก กล่าวคือ มีค่าประมาณ 35.9% ของ ADP และ 25.7% ของ DNP ในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท และมีค่าประมาณ 43.2% ของ ADP และ 31.0% ของ DNP เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

3. ผลของ amiodarone ในขนาด 20 μM และ 50 μM ที่มีต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราส่วนของ ADP/O (ตารางที่ 3)

3.1 กรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

เอทธานอลในปริมาณเท่ากับที่ใช้ละลาย amiodarone (5 μl) จะไม่มีผลต่อคุณภาพของไมโตคอนเดรีย (RCI = 5.76 และ P/O = 3.16 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท) และเมื่อใส่ amiodarone ทั้งในขนาด 20 และ 50 μM พบว่าจะมีการลดลงของค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O กล่าวคือ เมื่อใส่ amiodarone ในขนาด 20 μM ลงไปทำปฏิกิริยา จะทำให้ค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ลดลงเป็น 3.20 ± 0.06 และ 2.66 ± 0.13 ตามลำดับ ส่วน amiodarone ในขนาด 50 μM จะทำให้ค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ลดลงเป็น 2.01 ± 0.14 และ 2.15 ± 0.09 ตามลำดับ เช่นเดียวกัน

3.2 กรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่า ผลของ amiodarone ต่อค่า parameters ทั้งสอง จะมีลักษณะคล้ายกับในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท กล่าวคือ เมื่อใช้ amiodarone ในขนาด 20 μM จะทำให้ค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ลดลงเป็น 2.48 ± 0.16 และ 1.64 ± 0.08 ตามลำดับ ส่วน amiodarone ในขนาด 50 μM จะทำให้ค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ลดลงเป็น 1.55 ± 0.13 และ 1.46 ± 0.05 ตามลำดับ

จากทั้งสองกรณีดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า amiodarone มีผลทำให้ค่า parameters ต่าง ๆ ที่ใช้วัดการทำงานของไมโตคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

4. ผลของสารบางอย่างต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย

4.1 ผลของ oligomycin ที่มีต่อผลการกระตุ้นการหายใจโดย amiodarone เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ในรูป 17 A แสดงผลของ amiodarone ในขนาด 50 μM ในการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย (0.061) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใส่ oligomycin ก่อนจะใส่ amiodarone ลงไปทำปฏิกิริยา จะเห็นว่า amiodarone ยังคงสามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ของไมโตคอนเดรียได้ (0.064) นั่นคือ oligomycin ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการหายใจที่เกิดจาก amiodarone (รูปที่ 17 B) ในทำนองเดียวกัน oligomycin ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์การกระตุ้นการหายใจของ DNP ได้ (รูปที่ 17 C)

4.2 ผลของ DTT และ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ในรูปที่ 18 A แสดงถึง control respiratory response ตามปกติของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ส่วนรูป 18 B แสดงถึงผลของ amiodarone ในขนาด 50 μM ในการกระตุ้น state 4 respiration ของไมโตคอนเดรีย

DTT (dithiothreitol) ซึ่งเป็นสารที่ป้องกัน sulfhydryl group (-SH) ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การกระตุ้น state 4 respiration ของ amiodarone ดังรูปที่ 18 C ส่วน DTNB ซึ่งเป็นสารประกอบพวก disulfide ที่สามารถจับกับ sulfhydryl groups ได้ และสามารถยับยั้งการเกิด state 3 respiration (ไม่ได้แสดงในรูป) ในรูปที่ 18 D จะเห็นว่า เมื่อเติม DTNB จะทำให้ฤทธิ์การกระตุ้น state 4 respiration ของ amiodarone ลดลง

ผลของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนูขาว

1. ผลของ amiodarone ต่อ state 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย (ตารางที่ 4)

1.1 กรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

เมื่อ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย amiodarone ในขนาด 100 μM เป็นเวลา 5 นาที พบว่า amiodarone สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration (คือ ในสภาวะที่เกิด uncoupling ของไมโตคอนเดรียเนื่องจากการใส่ DNP ทำให้เกิดการไม่ควบคู่กันระหว่างกระบวนการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ กับการเกิดฟอสฟอริลเลชั่นของ ADP) กล่าวคือ อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงจาก 0.188 $\pm$ 0.026 เป็น 0.007 $\pm$ 0.001 มคอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน

1.2 กรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ผลการทดลองที่ได้ จะมีลักษณะคล้ายกับกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท กล่าวคือ จะมีการลดลงของอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration (หลังจาก preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย amiodarone ในขนาด 100 μM เป็นเวลา 5 นาที) จาก 0.249 $\pm$ 0.033 เป็น 0.043 $\pm$ 0.003 มคอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน

1.3 กรณีที่ใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท

ในตารางที่ 4 จะเห็นว่า amiodarone ในขนาด 100 μM จะลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังจาก preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย amiodarone เป็นเวลา 5 นาที กล่าวคือ จะเปลี่ยนแปลงจาก 0.283 $\pm$ 0.032 เป็น 0.258 $\pm$ 0.028 มคอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน และการลดลงนี้ ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า amiodarone สามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท ซึ่งส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจโดยผ่าน NADH และ

$FADH_2$ ตามลำดับ และผลการยับยั้งนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ amiodarone ไม่มีผลยับยั้งการหายใจเมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท ซึ่งส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ cytochrome C โดยตรง

2. ผลของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD^+-linked substrates ชนิดต่าง ๆ

2.1 กรณีที่ใช้ β-hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท

ในรูปที่ 19 A แสดงถึงการกระตุ้นการหายใจโดย DNP จะเห็นว่าเอทธานอลในปริมาณเท่ากับที่ใช้ละลาย amiodarone (10 µl) จะไม่มีผลยับยั้งการเกิด state 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งกระตุ้นโดย DNP แต่เมื่อ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย amiodarone ในขนาด 100 µM เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะใส่ DNP ลงไปทำปฏิกิริยา (รูปที่ 19 B) พบว่า amiodarone สามารถยับยั้งการเกิด state 3u respiration จากการกระตุ้นโดย DNP ได้ แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สับสเตรท หรือยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจาก NADH ไปยังออกซิเจน โดย amiodarone

2.2 กรณีที่ใช้ pyruvate เป็นสับสเตรท

ผลการทดลองที่ได้ จะมีลักษณะคล้ายกรณีที่ใช้ β-hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท pyruvate เป็น NAD^+-linked substrate ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงในไมโตคอนเดรียเป็น acetyl co-A และเข้าสู่ Krebs cycle ต่อไป ในรูปที่ 19 C จะเห็นว่าเอทธานอลในปริมาณ 10 µl ไม่มีผลต่อการเกิด state 3u respiration ของไมโตคอนเดรียจากการใส่ DNP แต่เมื่อใส่ amiodarone ในขนาด 100 µM ลงไปทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที ก่อนใส่ DNP ดังรูปที่ 19 D พบว่า amiodarone สามารถยับยั้ง state 3u respiration ได้เช่นเดียวกัน

2.3 กรณีที่ใช้ α-ketoglutarate เป็นสับสเตรท

α-ketoglutarate เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่อยู่ใน Krebs cycle ผลการทดลองที่ได้มีลักษณะคล้ายกับกรณีที่ใช้ β-hydroxybutyrate เป็นสับสเตรทเช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 20 A และ 20 B

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า amiodarone สามารถยับยั้งการเกิด state 3u respiration เมื่อใช้ NAD^+-linked substrate ทั้ง 3 ชนิด เช่นเดียวกับ glutamate + malate

3. ผลของ amiodarone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท โดยเปรียบเทียบกับ DNP

Ascorbate + TMPD เป็น artificial substrate ซึ่งสามารถส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจไปยัง cytochrome C โดยตรง ดังนั้น การใช้สับสเตรทชนิดนี้จะทำให้อัตราส่วนของ ADP/O เท่ากับ 1 ทั้งนี้เนื่องจากการส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจของสับสเตรทชนิดนี้ จะอยู่หลังตำแหน่ง (sites) ที่มีการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระจากการส่งผ่านอิเลคตรอนมากพอที่จะนำไปสร้าง ATP ได้ 2 ตำแหน่ง คือ site I และ site II (บทที่ 1) ดังนั้น สารใด ๆ ที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ site I และ II จะไม่มีผลต่อการส่งผ่านอิเลคตรอนเมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท

ในตารางที่ 5 จะเห็นว่า amiodarone ในขนาด 100 μM สามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ state 4 respiration ได้ โดยไม่มีการยับยั้งการหายใจตามมาในระยะหลัง ดังที่พบจากการใช้ NAD^+-linked substrates และ succinate ดังที่กล่าวไว้ในตอนต้น และการเพิ่มการใช้ออกซิเจนที่เกิดขึ้นนี้ มีค่าน้อยกว่าการใช้ออกซิเจนที่ถูกกระตุ้นโดย DNP ทั้ง amiodarone และ DNP สามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กล่าวคือ มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.156 ± 0.010 เป็น 0.210 ± 0.018 และ 0.242 ± 0.017 มคอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ

4. ผลของสารบางอย่าง และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน incubation medium บางประการ ต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย

4.1 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium

ผลการทดลองในรูปที่ 21 A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งผลไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะใช้ medium ที่มี pH 7.0, 7.2 หรือ 7.4 ส่วนรูปที่ 21 B แสดงผลเปรียบเทียบฤทธิ์ของ amiodarone

ในขนาด 100 μM ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อถูก incubate อยู่ใน medium ที่มี pH 7.0, 7.2 และ 7.4 จะเห็นว่าในทั้งสามกรณี อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะแรก ๆ หลังจากใส่ amiodarone ลงไปทำปฏิกิริยาเกือบจะไม่แตกต่างกัน แต่ในระยะหลังพบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเมื่ออยู่ใน medium ที่มี pH 7.0 จะลดลงเร็วกว่าและมากกว่าเมื่ออยู่ใน medium ที่มี pH 7.2 และ 7.4 ตามลำดับ นั่นคือ ที่ pH 7.0 amiodarone สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจ (state 4 respiration) ของไมโตคอนเดรียได้เร็วกว่าและมากกว่าที่ pH 7.2 และ 7.4

4.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone

ในรูปที่ 22 A และ 22 B แสดงถึง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ที่อุณหภูมิ 37°C จะมีอัตราการใช้ออกซิเจนสูงกว่าที่ 30°C ในทุกระยะ (states) ของการหายใจของไมโตคอนเดรีย

จากผลการทดลองในรูป 22 C จะเห็นว่า ที่อุณหภูมิ 37°C amiodarone สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 30°C

4.3 ผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

การทดลองในรูปที่ 23 จะ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย amiodarone ในขนาด 100 μM หรือ เอทธานอล 10 μl ก่อนจะใส่สับสเตรทลงไปทำปฏิกิริยา ในรูปที่ 23 A จะเห็นว่า เอทธานอลในปริมาณเท่ากับที่ใช้ละลายตัวยา (10 μl) ไม่มีผลต่อการเกิด state 3u respiration จากการใส่ DNP แสดงว่า การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรียยังคงเกิดได้ตามปกติ แต่เมื่อ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย 100 μM amiodarone (รูปที่ 23 B) พบว่า amiodarone สามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจ หรือ state 3u respiration ที่เกิดจากการใส่ DNP ได้ นั่นคือมีการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ หรือมีการยับยั้งการออกซิไดซ์สับสเตรทโดยใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียนั่นเอง และพบว่า DTT ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการเกิด state 3u respiration ดังรูปที่ 23 C

4.4 ผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ผลการทดลองในรูปที่ 24 ซึ่งมีการ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย 100 μM amiodarone หรือ เอทธานอล 10 μl เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมสับสเตรทเช่นเดียวกัน และจะเห็นว่าได้ผลในลักษณะคล้ายการใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท กล่าวคือ เอทธานอลในปริมาณเท่ากับที่ใช้ละลายตัวยา (10 μl) ไม่มีผลต่อการเกิด state 3u respiration ของไมโตคอนเดรียเมื่อใส่ DNP (รูปที่ 24 A) ส่วน amiodarone สามารถยับยั้งผลการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ DNP ได้ (รูปที่ 24 B) และ DTT ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการเกิด state 3u respiration ดังกล่าว (รูปที่ 24 C)

4.5 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Mg^{2+} ใน incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone

ในรูปที่ 25 A แสดงถึงการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย (state 3u respiration) โดย DNP เมื่อไมโตคอนเดรียถูก incubate ใน medium ที่มี 1.88 mM $MgCl_2$ และเอทธานอลในปริมาณ 10 μl ไม่ยับยั้งผลดังกล่าว ส่วนการทดลองอื่น ๆ ในลักษณะเดียวกัน แต่ใช้ incubation medium ที่มี 4.71 mM $MgCl_2$, 9.42 mM $MgCl_2$ หรือไม่มี $MgCl_2$ (0 mM $MgCl_2$) แทน พบว่า จะได้ผลไม่แตกต่างกับกรณีที่ใช้ medium ที่มี 1.88 mM $MgCl_2$ (ไม่ได้แสดงในรูป)

ในรูป 25 B แสดงการเปรียบเทียบผลของ amiodarone ในขนาด 100 μM ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อถูก incubate อยู่ใน medium ที่มี $MgCl_2$ ในขนาดต่าง ๆ กันคือ สภาวะไม่มี $MgCl_2$ (0 mM $MgCl_2$), 1.88 mM $MgCl_2$, 4.71 mM $MgCl_2$ และ 9.42 mM $MgCl_2$ จะเห็นว่า amiodarone สามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ของไมโตคอนเดรียเมื่อถูก incubate อยู่ใน medium ที่ไม่มี Mg^{2+} ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ใน medium ที่มี 1.88 mM, 4.71 mM และ 9.42 mM $MgCl_2$ ตามลำดับ จากผลดังกล่าวนี้ แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของ Mg^{2+} ในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

4.6 ผลของ bovine serum albumin (BSA)

ผลการทดลองในรูปที่ 26 A แสดง control respiratory response ตามปกติของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง และในรูป 26 B การใส่ ADP + Pi หลังจากใส่ BSA จะเห็นว่า ADP + Pi ยังคงสามารถกระตุ้นการเกิด state 3 respiration ได้ กล่าวคือ มีการเพิ่มการใช้ออกซิเจนจากการเติม ADP และมีการ cut-off ของ tracing เมื่อ ADP ถูกใช้หมดไป แสดงว่า BSA ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ ADP หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ BSA ไม่มีผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชั่น ไม่จับกับ ADP + Pi และสับสเตรทที่ใช้ (glutamate + malate) เหตุที่ไม่เติม DNP ในการทดลองรูปที่ 26 B เนื่องจาก BSA สามารถจับกับ DNP ทำให้ DNP ออกฤทธิ์ได้น้อยลงหรือออกฤทธิ์ไม่ได้

เมื่อใช้ BSA ในขนาดต่าง ๆ กันคือ 5, 10, 20 และ 30 mg เพื่อเปรียบเทียบผลต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย (รูปที่ 26 C) จะเห็นว่า BSA ในขนาด 30 mg ทำให้ amiodarone สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้เร็วขึ้น และเร็วกว่า 20 mg, 10 mg และ 5 mg ตามลำดับ ในขณะที่การออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดย amiodarone ในช่วงแรก ๆ จะไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วน BSA ในขนาด 5 mg จะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียแทบไม่แตกต่างจาก control (สภาวะที่ไม่มี BSA)

ผลของ amiodarone ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

ศึกษาผลของ amiodarone และ DNP ต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยการวัดปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP (บทที่ 2) และจากผลการทดลองในตารางที่ 6 สามารถสรุปผลเป็นกรณีต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. เอทธานอลในขนาด 10 µl จะไม่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) กลุ่มควบคุมในที่นี้คือ การทดลองที่ไม่มีการเติมสารใด ๆ ซึ่งจะพบว่ามี ATPase activity ที่ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะปกติ เอนไซม์ ATP synthase หรือ F_1F_o-ATPase จะทำงานในทิศทางการสร้าง ATP จาก ADP + Pi

2. amiodarone ในขนาด 100 uM สามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเอทธานอล 10 µl และผลการกระตุ้นนี้สามารถยับยั้งโดย oligomycin (ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase) และการยับยั้งนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ

3. DNP สามารถกระตุ้นการสลายตัวของ ATP ได้อย่างมาก เนื่องจากสารชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น uncoupler ซึ่งสามารถกระตุ้น ATPase activity ได้ โดยทำให้มีการสลายตัวของ ATP ไปเป็น ADP + Pi คือ มีผลในทางตรงข้ามกับหน้าที่ปกติของไมโตคอนเดรียในการสร้าง ATP (บทที่ 1) และผลการกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ของ DNP สามารถถูกยับยั้งด้วย oligomycin เช่นเดียวกัน และมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. จากการเปรียบเทียบการกระตุ้น ATPase activity โดย DNP และ amiodarone จะเห็นได้ว่า amiodarone ในขนาด 100 µM สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้น้อยกว่า 0.1 mM DNP กล่าวคือ สามารถกระตุ้น ATPase ได้เพียง 44.4% ของ DNP เท่านั้น

5. เมื่อใส่ 0.1 mM DNP ร่วมกับ amiodarone ในขนาด 100 µM จะทำให้ฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ของ DNP ลดลง คือปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจะลดลงจาก 3.49 $\pm$ 0.10 เป็น 3.11 $\pm$ 0.10 มคม.Pi/มก.โปรตีน/10 นาที และมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การยับยั้งที่เกิดขึ้นจะมีค่าน้อยกว่าผลของ oligumycin ในการยับยั้งการกระตุ้น ATPase ของ DNP อย่างมาก

ผลของ amiodarone ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย Ca^{2+} และเปรียบเทียบกับ DNP

ตามรูปที่ 27 A แสดงถึงการหายใจตามปกติของไมโตคอนเดรีย (control respiratory response) โดยที่การเติม ADP + Pi จะทำให้เกิดการหายใจใน state 3 และต่อมามีการ cut-off เมื่อ ADP ถูกใช้หมดไป และการใส่ DNP ในตอนหลังจะทำให้เกิด state 3u respiration จนกระทั่งออกซิเจนใน reaction chamber ถูกใช้หมดไป

เมื่อมีการเติม Ca^{2+} (ในสภาวะที่มี Pi อยู่) พบว่า Ca^{2+} สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้เช่นเดียวกับการใส่ ADP + Pi ลงไปทำปฏิกิริยา และอัตราการหายใจจะช้าลงเมื่อ Ca^{2+} ถูกสะสมโดยไมโตคอนเดรีย ดังรูปที่ 27 B การใส่ amiodarone ในขนาด 100 µM ลงไปทำปฏิกิริยาก่อนที่จะใส่ Ca^{2+} พบว่า Ca^{2+} ไม่สามารถ

กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้อีก ดังรูปที่ 27 C ทั้งนี้เนื่องจาก amiodarone ในขนาด 100 μM สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

เมื่อใส่ amiodarone ในขนาด 50 μM ลงไปทำปฏิกิริยา amiodarone ในขนาดที่ใช้นี้ ยับยั้งการเกิด state 3u respiration จากการกระตุ้นโดย DNP ได้เป็นบางส่วน โดยจะลดลงประมาณครึ่งหนึ่งของสภาวะปกติ (รูป 27 D เปรียบเทียบกับรูป 27 A) กล่าวคือ จาก 0.331 เป็น 0.178 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อใส่ amiodarone ในขนาดเดียวกันนี้ลงไปทำปฏิกิริยาก่อนที่จะเติม Ca^{2+} พบว่า amiodarone สามารถยับยั้งการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนโดย Ca^{2+} ได้เพียงบางส่วนเช่นเดียวกัน โดยจะลดลงประมาณครึ่งหนึ่งของสภาวะปกติ (รูป 27 E เปรียบเทียบกับรูป 27 B) กล่าวคือ จาก 0.303 เป็น 0.158 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที

ผลของ amiodarone ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity

การศึกษานี้จะใช้ tyramine เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ monoamine oxidase ดังที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 การทดลองนี้จะมี rotenone ซึ่งเป็น respiratory chain inhibitor อยู่ใน reaction mixture ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrates โดยไมโตคอนเดรีย ดังนั้นการใช้ออกซิเจนที่เกิดขึ้นจึงเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ MAO และเกิดจากปฏิกิริยา oxidative deamination เท่านั้น

รูปที่ 28 A แสดงถึง control response ของไมโตคอนเดรียเมื่อได้รับ tyramine จะเห็นได้ว่า tyramine สามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้ ทั้งนี้เนื่องจากมีการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ tyramine โดยไมโตคอนเดรีย และเอทธานอลไม่มีผลยับยั้งการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนโดย tyramine

ในรูปที่ 28 B, 28 C และ 28 D พบว่า amiodarone ในขนาดต่าง ๆ กัน คือ 10 μM, 50 μM และ 100 μM ตามลำดับ ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนโดย tyramine แสดงว่า amiodarone ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นนอก (outer membrane) ของไมโตคอนเดรีย และไม่พบความแตกต่างกันของอัตราการใช้ออกซิเจนที่ 5 นาที (ไม่ได้แสดงในรูป) ส่วน pargyline ซึ่งเป็น MAO inhibitor สามารถยับยั้งการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนที่เกิดจาก tyramine ได้ ดังรูปที่ 28 E ซึ่งเป็นการยืนยันว่า การกระตุ้นการหายใจที่เกิดจาก tyramine ในการทดลองนี้ เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ MAO