

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

ผลของสารสังเคราะห์ CU-763-15-13 ต่อการหายใจและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชันของไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนูขาว

#### 1. ผลของ CU-763-15-13 ในขนาดต่างๆที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆของไมโทคอนเดรีย

##### 1.1 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 24 แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองในระยะแรกของ tracing 24 A ส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยามีเพียงไมโทคอนเดรียใน incubation medium ที่มี glutamate + malate เป็นสับสเตรทอยู่ในปริมาณที่มากเพียงพอที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยา รัชนีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียยังต่ำอยู่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.36 n atoms O/ml/min รัชนีนี้เรียกว่า state 4 respiration (ส่วนประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยาคือไมโทคอนเดรีย ออกซิเจนและสับสเตรท) รัชนีต่อไปของ oxygraph tracing เรียกว่า state 3 respiration เกิดจากการเติม 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi ลงไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP ขึ้น ( $ADP + Pi \longrightarrow ATP$ ) ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นเป็น 118.64 n atoms O/ml/min และ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะลดลงเป็น 14.83 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิมเมื่อ ADP ถูกใช้หมดไปในการทำปฏิกิริยา และการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP เรียกว่าไมโทคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโทคอนเดรีย ค่าที่แสดงถึงการควบคุมการหายใจคือ respiratory control index (RCI) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly couple mitochondria หรือไม่ ซึ่งค่า RCI นี้จะคำนวณได้จากอัตราการหายใจใน state 3 / อัตราการหายใจใน state 4 ดังนั้น RCI ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองตามรูปที่ 21 จึงเท่ากับ  $118.64 / 14.83 = 8$  และเมื่อเติม 0.06 mM DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler จะทำให้การควบคุมการหายใจของไมโทคอนเดรียนี้เสียไปโดยที่ DNP สามารถกระตุ้นให้มีการหายใจได้คล้าย state 3 respiration แม้จะไม่มี ADP ก็ตาม (ไม่มีการสังเคราะห์ ATP) เรียกว่า state 3u respiration ซึ่งมีผลทำให้ไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันไป จะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในรัชนีเพิ่มขึ้นเป็น 158.19 n atoms O/ml/min และการใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไปจนกระทั่ง

ออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ( $O_2 \sim 0$ ) ส่วนค่า  $P/O = 256.32/93.92 = 2.73$  ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล(วิธีคำนวณในบทที่ 2)

ใน tracing 24 B ได้แสดงให้เห็นว่า DMSO 10  $\mu$ l ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ CU-763-15-13 ไม่มีผลกระตุ้นต่อ state 4 respiration เนื่องจากค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไมโทคอนเดรียสามารถทำหน้าที่ได้เหมือนปกติ

tracing 24 C, D, E, F แสดงให้เห็นว่า CU-763-15-13 ไม่มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 4 แต่สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration กล่าวคือเมื่อเติม CU-763-15-13 ในขนาด 50 $\mu$ g (0.23  $\mu$ M), 100  $\mu$ g (0.45  $\mu$ M), 150 $\mu$ g (0.68  $\mu$ M), และ 200 $\mu$ g (0.91  $\mu$ M) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม 0.31 mM ADP +0.62 mM Pi พบว่า CU-763-15-13 สามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น 54.38 , 39.99, 22.25 และ 19.88 n atoms O/ml/min ตามลำดับและพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ลดลงเป็น 84.04, 69.98, 39.55 และ 34.60 n atoms O/ml/min ตามลำดับเมื่อเติม DNP ลงไปในปฏิกิริยา

CU-763-15-13 ในขนาดต่างๆที่มีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทรูปที่ 25 จะเห็นได้ว่าความแรงในการลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และใน state 3u จะเริ่มตั้งแต่ขนาด 25  $\mu$ g (0.11 $\mu$ M) โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเรื่อยๆโดยมีแนวโน้มที่จะคงที่และมีอัตราการใช้ออกซิเจนต่ำสุดที่สาร CU-763-15-13 ขนาดตั้งแต่ 150  $\mu$ g (0.68  $\mu$ M) จนถึง 250  $\mu$ g (1.136  $\mu$ M) ดังแสดงในกราฟ (A) ขนาดของสาร CU-763-15-13 ที่สามารถยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ซึ่งเท่ากับ 55.26  $\mu$ g (0.25 $\mu$ M) และค่า  $IC_{50}$  สำหรับยับยั้งการกระตุ้นการหายใจด้วย DNP มีค่าเท่ากับ 50.73  $\mu$ g (0.231 $\mu$ M) กราฟ (B)

## 1.2 เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ทำการทดลองเช่นเดียวกับเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท แต่จะเปลี่ยนสับสเตรทที่ใช้เป็น succinate และเติม 10  $\mu$ g rotenone ตามรูป 26 อัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติม rotenone เท่ากับ 41.87 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 41.87 n atoms O/ml/min พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนไม่เปลี่ยนแปลงจากนั้นเติม 0.31 mM ADP +0.62 mM Pi เพื่อทำให้เกิด state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมากเท่ากับ 214.60 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมดไปอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเท่ากับ 52.34 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิมและเมื่อเติม DNP เพื่อเข้าสู่ state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเท่ากับ 382.09 n atoms O/ml/min การใช้ออกซิเจนนี้จะ

เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องกันไปจนกระทั่งออกซิเจนใน reaction chamber หมดไป ( $O_2 \sim 0$ ) ส่วนค่า P/O =  $256.32 / 136.08 = 1.88$  ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 2 โมเลกุล (วิธีคำนวณในบทที่ 2)

ส่วน DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ CU-763-15-13 นั้นไม่มีผลกระทบต่อ state 4 respiration แต่ประการใด (รูปที่ 26 B)

tracing 26 C, D, E และ F แสดงให้เห็นว่า ก่อนเติมสาร CU-763-15-13 นั้นมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 41.87 n atoms O/ml/min และ เมื่อเติมสารตั้งแต่ในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.23  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{g}$  (0.45  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.68  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{g}$  (0.91  $\mu\text{M}$ ) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจ state 4 respiration โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น 62.81, 68.04, 86.75 และ 88.98 n atoms O/ml/min ตามลำดับ จากนั้นเติม 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi พบว่า CU-763-15-13 ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น 214.60, 209.36, 177.96 และ 141.32 n atoms O/ml/min ตามลำดับ และเมื่อเติม 0.06 mM DNP ลงไปในปฏิกิริยา พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ในรูปที่ 27 การศึกษาถึง Dose-response curve ของ CU-763-15-13 ในขนาดต่างๆที่มีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท จะเห็นได้ว่าขนาดของสารที่เริ่มมีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เท่ากับ 150  $\mu\text{g}$  (0.68  $\mu\text{M}$ ) โดยเริ่มมีการลดการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อเพิ่มขนาดของสาร นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดสารที่เพิ่มขึ้นนั้น ได้ไปมีผลในการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration โดยเริ่มที่ขนาดสารตั้งแต่ 25  $\mu\text{g}$  (0.11  $\mu\text{M}$ ) และเริ่มมีอัตราการใช้ออกซิเจนที่มีแนวโน้มจะคงที่ ที่ขนาดสาร 250  $\mu\text{g}$  (0.91  $\mu\text{M}$ )

1.3 ผลของ CU-763-15-13 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $NAD^+$ -linked substrate ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ glutamate + malate

### 1.3.1 เมื่อใช้ $\alpha$ -ketoglutarate เป็นสับสเตรท

เมื่อทำการศึกษาผลของ CU-763-15-13 ในขนาดต่างๆต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆเมื่อใช้  $\alpha$ -ketoglutarate เป็นสับสเตรทได้ผลคือ

ตามรูป 28 tracing 28B แสดงใน state 4 respiration ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ก่อนเติม DMSO เท่ากับ 15.34 n atoms O/ml/min และหลังการเติมเท่ากับ 15.17 n atoms O/ml/min จากนั้นเติม 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi เพื่อทำให้เกิด state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมากเท่ากับ 91 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 17.8 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม 0.06 mM DNP เพื่อเข้าสู่ state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเท่ากับ 93.53 n atoms O/ml/min อัตราการใช้ออกซิเจนจะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไปจนกระทั่งออกซิเจนใน reaction chamber หมดไป ( $O_2 \sim 0$ ) ส่วนค่า  $ADP/O = 256.32/101.69 = 2.52$  ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล

tracing 28 C, D, E และ F แสดงให้เห็นว่า CU-763-15-13 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration กล่าวคือ เมื่อเติมสารในขนาด 50 $\mu$ g (0.23  $\mu$ M), 100 $\mu$ g (0.45  $\mu$ M), 150 $\mu$ g (0.68  $\mu$ M) และ 200 $\mu$ g (0.91  $\mu$ M) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi พบว่า CU-763-15-13 ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น 55.61, 40.45, 30.68 และ 25.28 n atoms O/ml/min ตามลำดับและเมื่อเติม 0.06 mM DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ลดลงเป็น 80.89, 60.67, 51.14 และ 40.45 n atoms O/ml/min ตามลำดับเช่นกัน

รูปที่ 29 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาด 50 $\mu$ g (0.23  $\mu$ M), 100 $\mu$ g (0.45  $\mu$ M), 150 $\mu$ g (0.68  $\mu$ M), และ 200 $\mu$ g (0.91  $\mu$ M) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

### 1.3.2 เมื่อใช้ $\beta$ -hydroxybutyrate เป็นตัวสเตรท

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับ 1.3.1 โดยเปลี่ยนตัวสเตรทที่ใช้เป็น  $\beta$ -hydroxybutyrate จะได้ผลดังนี้คือ

state 4 respiration ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติม DMSO เท่ากับ 10.11 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 10.11 n atoms O/ml/min ซึ่งถือว่าอัตราการใช้ออกซิเจนไม่เปลี่ยนแปลง และเป็นการแสดงให้เห็นว่า DMSO ไม่มีผลกระตุ้นต่อ state 4 respiration (รูป 30 B) จากนั้นเติม 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi เพื่อทำให้เกิด state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมากเท่ากับ 91 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 15.17 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม 0.06 mM DNP เพื่อเข้าสู่ state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเท่ากับ 96.06 n atoms O/ml/min การใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องกันไปจนกระทั่งออกซิเจนใน

reaction chamber หดไป ( $O_2 \sim 0$ ) ส่วนค่า  $ADP/O = 256.32/91.00 = 2.82$  ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล

tracing 30 C, D, E และ F แสดงให้เห็นว่า CU-763-15-13 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration กล่าวคือเมื่อเติมสารในขนาด  $50\mu\text{g}$  ( $0.23\ \mu\text{M}$ ),  $100\mu\text{g}$  ( $0.45\ \mu\text{M}$ ),  $150\mu\text{g}$  ( $0.68\ \mu\text{M}$ ) และ  $200\mu\text{g}$  ( $0.91\ \mu\text{M}$ ) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม  $0.31\ \text{mM ADP} + 0.62\ \text{mM Pi}$  พบว่า CU-763-15-13 ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น 40.45, 30.33, 17.69 และ 15.17 n atoms O/ml/min ตามลำดับและเมื่อเติม  $0.06\ \text{mM DNP}$  พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ลดลงเป็น 65.72, 50.55, 32.49 และ 27.49 n atoms O/ml/min ตามลำดับเช่นกัน

รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดต่างๆที่ผลต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ซึ่งพบว่าในขนาด  $50\mu\text{g}$  ( $0.23\ \mu\text{M}$ ),  $100\mu\text{g}$  ( $0.45\ \mu\text{M}$ ),  $150\mu\text{g}$  ( $0.68\ \mu\text{M}$ ) และ  $200\mu\text{g}$  ( $0.91\ \mu\text{M}$ ) จะมีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า CU-763-15-13 สามารถยับยั้งการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\text{NAD}^+$ -linked substrate ทั้ง 3 ชนิด คือ glutamate+malate,  $\alpha$ -ketoglutarate,  $\beta$ -hydroxybutyrate

## 2. ผลของ CU-763-15-13 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic - shocked mitochondria

รูปที่ 32 oxygraph tracing แสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดต่างๆต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆใน osmotic - shocked mitochondria กล่าวคือ

tracing 32 B เมื่อ preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย DMSO (ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของ CU-763-15-13) นาน 1 นาทีหลังจากเติม DMSO มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ  $14.35\ \text{n atoms O/ml/min}$  ซึ่งเท่ากับอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนการเติม DMSO จากนั้นจึงเติม  $1.04\ \text{mM NADH}$  อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น  $153.08\ \text{n atoms O/ml/min}$  จนไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนใน reaction chamber จนหมด (รูปที่ 32 B)

tracing 32 C, D, E และ F เมื่อ preincubate osmotic- shocked mitochondria ด้วยสารในขนาด  $50\mu\text{g}$  ( $0.23\ \mu\text{M}$ ),  $100\mu\text{g}$  ( $0.45\ \mu\text{M}$ ),  $150\mu\text{g}$  ( $0.68\ \mu\text{M}$ ) และ  $200\mu\text{g}$  ( $0.91\ \mu\text{M}$ ) นาน 1 นาที ต่อจากนั้นจึงเติม  $1.04\ \text{mM NADH}$  ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นเพื่อให้เกิด state 3u respiration พบว่าในขนาดสารนี้ทำให้อัตรา



การใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration จะมีค่าเท่ากับ 81.33, 62.19, 47.84 และ 19.14 n atoms O/ml/min ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

รูปที่ 33 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดต่างๆที่มีผลต่ออัตราการหายใจในสภาวะ osmotic - shocked mitochondria ซึ่งพบว่าในขนาด 50 $\mu$ g (0.28 $\mu$ M), 100 $\mu$ g (0.45 $\mu$ M), 150 $\mu$ g (0.68) และ 200 $\mu$ g (0.91 $\mu$ M) มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ control

### 3. ปัจจัยอื่นๆหรือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบบางประการใน incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย

#### 3.1 ผลของ rotenone

ในตารางที่ 7 แสดงผลของการให้ rotenone ร่วมกับ CU-763-15-13 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นตัวกระตุ้น โดยในกลุ่ม control จะใช้ DMSO ซึ่งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เท่ากับ  $54.48 \pm 8.14$  n atoms O/ min/mg protein และเมื่อเติม 20 ng rotenone พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ  $32.86 \pm 5.10$  n atoms O/ min/mg protein ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) หรือลดประมาณครึ่งหนึ่งของ control (rotenone เป็นสารที่ใช้ยับยั้ง complex I) CU-763-15-13 ในขนาด 50  $\mu$ g (0.28 $\mu$ M), และ 100 $\mu$ g (0.45 $\mu$ M) มีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น  $25.54 \pm 3.49$  และ  $16.86 \pm 2.47$  n atoms O/ min/mg protein ตามลำดับ เมื่อ preincubate ไมโทคอนเดรียกับ 20 ng rotenone และสาร CU-763-15-13 ขนาด 50  $\mu$ g (0.28 $\mu$ M), และ 100 $\mu$ g (0.45 $\mu$ M) พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงมากยิ่งขึ้นเป็น  $12.67 \pm 1.36$  และ  $8.69 \pm 1.31$  n atoms O/ min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ส่วนอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration พบว่าในกลุ่ม control มีอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration เท่ากับ  $73.43 \pm 11.22$  n atoms O/ min/mg protein และเมื่อเติม 20 ng rotenone พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ  $43.02 \pm 6.31$  n atoms O/ min/mg protein ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเติมสาร CU-763-15-13 ในขนาด 50  $\mu$ g (0.28 $\mu$ M) และ 100 $\mu$ g (0.45  $\mu$ M) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเท่ากับ  $40.66 \pm 6.30$  และ  $30.25 \pm 4.59$  n atoms O/ min/mg protein ตามลำดับ เมื่อ preincubate ไมโทคอนเดรียกับ 20 ng rotenone กับสารดังกล่าวข้างต้น พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงมากยิ่งขึ้นเป็น  $22.01 \pm 3.10$  และ  $15.24 \pm 2.44$  n atoms O/ min/mg protein ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

### 3.2 ผลของ bovine serum albumin (BSA)

รูปที่ 34 กราฟแสดงการเปรียบเทียบผลของการเติม BSA ในขนาดต่างๆคือ 5, 10, 20 และ 30 mg. ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 ในขนาด 150  $\mu$ g ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration จากกราฟจะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติมสารในขนาด 150  $\mu$ g (0.68  $\mu$ M) เป็นกลุ่ม control โดยไม่มีการเติม BSA เท่ากับ  $10.34 \pm 0.92$  n atoms O/min/mg protein และเมื่อเติม BSA ในขนาด 5, 10 และ 20 mg พบว่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียเท่ากับ  $12.46 \pm 1.66$ ,  $13.00 \pm 1.88$ ,  $13.69 \pm 1.98$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ แต่พบว่า BSA ที่ความเข้มข้น 30 mg อัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียเท่ากับ  $15.99 \pm 1.25$  n atoms O/min/mg protein ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

### 3.3 ผลของ dithiothreitol (DTT)

รูปที่ 35 แสดง tracing 35 B แสดง control respiratory response แสดงใน state 4 respiration ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติม DMSO เท่ากับ 10.85 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 13.56 n atoms O/ml/min ซึ่งถือว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเท่าเดิม จากนั้นเติม 0.31mM ADP + 0.62mM Pi เพื่อทำให้เกิด state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมาก เท่ากับ 108.51 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 16.28 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิมอีกครั้ง เมื่อเติม 0.06 mM DNP จะทำให้เกิด state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมากเท่ากับ 119.36 n atoms O/ml/min

tracing 35 C แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติม 1.04 mM DTT โดยการ preincubate กับไมโทคอนเดรียเป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติม DMSO พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration เท่ากับ 10.85 n atoms O/ml/min และหลังจากเติมเท่ากับ 13.56 n atoms O/ml/min เมื่อเติม 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เพิ่มขึ้นเท่ากับ 108.51 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 16.28 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม 0.06 mM DNP จะทำให้เกิด state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเท่ากับ 119.36 n atoms O/ml/min

tracing 35 D แสดงให้เห็นว่า CU-763-15-13 ในขนาด 150  $\mu$ g (0.68  $\mu$ M) สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration จาก 108.51 และ 119.36 n atoms O/ml/min (ใน tracing 35 B) ลงได้เท่ากับ 27.13 และ 43.40 n atoms O/ml/min ตามลำดับ

tracing 35 E เมื่อเติม 1.04 mM DTT preincubate ไว้ 1 นาทีก่อนการเติม CU-763-15-13 ในขนาด 150  $\mu\text{g}$  (0.68  $\mu\text{M}$ ) อัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 10.85 n atoms O/ml/min และหลังการเติม CU-763-15-13 มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 16.28 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม 0.31 mM ADP +0.62 mM Pi พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration เท่ากับ 32.55 และ 43.40 n atoms O/ml/min ตามลำดับ แสดงว่า 1.04 mM DTT ไม่สามารถลดฤทธิ์การยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียทั้ง state 3 และ state 3u respiration ของ CU-763-15-13 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ )

รูปที่ 36 กราฟแสดงผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 ในขนาด 150  $\mu\text{g}$  (0.68  $\mu\text{M}$ ) ที่มีผลต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อทำการทดลองเป็น 4 การทดลองและหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติม DTT ใน state 3 และ state 3u respiration เท่ากับ  $46.51 \pm 1.59$  และ  $55.15 \pm 3.26$  n atoms O/ min/mg protein ตามลำดับ แสดงว่า DTT ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อให้ DTT ร่วมกับสาร CU-763-15-13 ในขนาด 150  $\mu\text{g}$  (0.68  $\mu\text{M}$ ) พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration เท่ากับ  $11.80 \pm 1.28$  และ  $17.40 \pm 1.26$  n atoms O/ml/min ตามลำดับ มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนพอกับให้สารในขนาด 150  $\mu\text{g}$  (0.68  $\mu\text{M}$ ) อย่างเดียว ดังนั้น DTT ไม่สามารถลดฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration ของ CU-763-15-13 ได้

#### 4. ผลของ CU-763-15-13 ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

รูปที่ 37 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดต่างๆที่มีผลต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียมาวัดหาผลที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย โดยวัดหาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP (ตามวิธีการในบทที่ 2) จากรูป 37 จะเห็นได้ว่าจำนวน Pi liberate เมื่อ incubate mitochondria ด้วย CU-763-15-13 ในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.23  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{g}$  (0.45  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.68  $\mu\text{M}$ ) และ 200  $\mu\text{g}$  (0.91  $\mu\text{M}$ ) มีค่าเท่ากับ  $0.69 \pm 0.16$ ,  $0.69 \pm 0.17$ ,  $0.72 \pm 0.17$ ,  $0.74 \pm 0.19$   $\mu$  moles/mg protein/10 min ตามลำดับ แต่เมื่อมี DNP จะมีค่า Pi liberate เป็น  $2.82 \pm 0.59$   $\mu$  moles/mg protein/10 min แสดงว่า CU-763-15-13 ไม่มีคุณสมบัติกระตุ้น ATPase activity เมื่อเปรียบเทียบกับ DNP (เป็นสาร uncoupler ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity) โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ )



5. ผลของ CU-763-15-13 ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วย  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 38 oxygraph tracing แสดงผลของ  $\text{Ca}^{2+}$  ต่อการออกฤทธิ์ของ UC-763-15-13 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

tracing 38 A, B แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรีย เมื่อ preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย DMSO ที่ใช้เป็นตัวแทนของ CU-763-15-13

tracing 38 B แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติม 0.42 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ในสถานะที่มี Pi อยู่ พบว่า  $\text{Ca}^{2+}$  สามารถกระตุ้นไมโทคอนเดรียให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนได้เช่นเดียวกับการเติม 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi โดยตามปกติไมโทคอนเดรียจะนำพลังงานที่ได้จากการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจหรือ proton gradient มาใช้ในการขนส่ง  $\text{Ca}^{2+}$  เพื่อนำ  $\text{Ca}^{2+}$  มาสะสมบริเวณ endoplasmic reticulum (ER) ดังนั้นเมื่อเติม 0.42 mM  $\text{CaCl}_2$  ลงไปในปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทมากเพียงพอและมี Pi อยู่ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะเพิ่มสูงขึ้นและอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเมื่อ  $\text{Ca}^{2+}$  ถูกสะสมเป็นที่เรียบร้อยจากรูปแสดงให้เห็นว่าในกลุ่มควบคุมเมื่อได้รับ  $\text{Ca}^{2+}$  อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 117.08 n atoms O/ml/min และลดลงเป็น 23.42 n atoms O/ml/min

tracing 38 C เมื่อมีการเติม CU-763-15-13 ในขนาด 200  $\mu\text{g}$  พบว่าสารมีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเป็น 29.99 n atoms O/ml/min ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

รูปที่ 39 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.23  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{g}$  (0.45  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.68  $\mu\text{M}$ ) และ 200  $\mu\text{g}$  (0.91  $\mu\text{M}$ ) ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วย  $\text{Ca}^{2+}$  จากรูปพบว่าสารในขนาดต่างๆข้างต้นนี้มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ  $31.36 \pm 1.39$ ,  $23.36 \pm 1.18$ ,  $18.93 \pm 2.25$ ,  $12.15 \pm 0.69$  n atoms O/ml/min ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

6. ผลของ malonate (succinate dehydrogenase inhibitor) ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ในรูปที่ 40 tracing 40 A แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ก่อนเติม DMSO เท่ากับ 37.52 n atoms O/ml/min และหลังเติมมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 37.52 n atoms O/ml/min ซึ่งแสดงว่า DMSO ไม่มีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ของไมโทคอนเดรีย และเมื่อเติม 0.31 mM

ADP +0.62 mM Pi พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เท่ากับ 160.81 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 42.88 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม 0.06 mM DNP เพื่อเข้าสู่ state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกเป็น 241.21 n atoms O/ml/min อัตราการใช้ออกซิเจนจะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไปจนกระทั่งออกซิเจนใน reaction chamber หมดไป ( $O_2 \approx 0$ ) ส่วนค่า  $ADP/O = 256.32/151.67 = 1.69$  ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 2 โมเลกุล

tracing 40 B แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ก่อนเติม 2.5  $\mu$ M malonate เท่ากับ 32.16 n atoms O/ml/min และหลังเติมมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 21.44 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม 0.31 mM ADP +0.62 mM Pi พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเท่ากับ 37.52 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม 0.06 mM DNP เพื่อเข้าสู่ state 3u respiration พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration นั้นลดลงเท่ากับ 37.52 n atoms O/ml/min

tracing 40 C แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ก่อนเติมสาร CU-763-15-13 ในขนาด 150  $\mu$ g (0.68  $\mu$ M) มีค่าเท่ากับ 32.16 n atoms O/ml/min และหลังเติมสารมีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 69.68 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม 0.06 mM DNP ก็เพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 289.45 n atoms O/ml/min

tracing 40 D แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ก่อนเติม 2.5  $\mu$ M malonate มีค่าเท่ากับ 32.16 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 26.8 n atoms O/ml/min และเมื่อเติมสาร CU-763-15-13 150  $\mu$ g (0.68  $\mu$ M) พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเมื่อเทียบกับกรณีที่ไม่ได้เติม 2.5  $\mu$ M malonate เท่ากับ 26.80 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม 0.06 mM DNP พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเช่นกันซึ่งมีค่าเท่ากับ 32.16 n atoms O/ml/min

7. ผลของแคดเมียม ( $Cd^{2+}$ ) [succinate oxidation inhibitor] ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ในรูปที่ 42 tracing 42 A แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration เมื่อไม่มี 15  $\mu$ M  $CdCl_2$  มีค่าเป็น 143 และ 275.14 n atoms O/ml/min ตามลำดับ

tracing 42 B แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ก่อนเติม 15  $\mu$ M  $CdCl_2$  มีค่าเป็น 136.09 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม 15  $\mu$ M  $CdCl_2$  พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเป็น 13.09 n atoms O/ml/min

tracing 42 C แสดงผลของ  $15\mu\text{M CdCl}_2$  ที่สามารถลดการใช้ออกซิเจนเมื่อเติม  $\text{Cu-763-15-13}$   $150\mu\text{g}$  จาก  $73.28 \text{ n atoms O/ml/min}$  เป็น  $7.85 \text{ n atoms O/ml/min}$

#### 8. ผลของ $\text{Cu-763-15-13}$ ต่อการเกิด Lipid peroxidation

จากกราฟในรูปที่ 42 พบว่าสาร  $\text{Cu-763-15-13}$  ในความเข้มข้น  $50\mu\text{g}$  ( $0.28\mu\text{M}$ ),  $100\mu\text{g}$  ( $0.45\mu\text{M}$ ),  $150\mu\text{g}$  ( $0.68$ ) และ  $200\mu\text{g}$  ( $0.91\mu\text{M}$ ) นั้นมีการเพิ่มการเกิด lipid peroxidation โดยวัดปริมาณการเพิ่มขึ้นของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งวัดปริมาณความเข้มข้นของ MDA ได้เท่ากับ  $0.99\pm 0.04$ ,  $1.02\pm 0.12$ ,  $1.12\pm 0.05$ ,  $1.43\pm 0.05 \mu\text{mole/g protein}$  (คำนวณจากค่า extinction coefficient ซึ่งเท่ากับ  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ตามลำดับ โดยกลุ่มควบคุมจะใช้  $10 \mu\text{l DMSO}$  และความเข้มข้นที่เริ่มต้นเพิ่มการเกิด lipid peroxidation อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) คือ  $150 \mu\text{g}$  และมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นหากมีการเพิ่มขนาดของสารขึ้นไปอีก



รูปและตารางประกอบผลการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

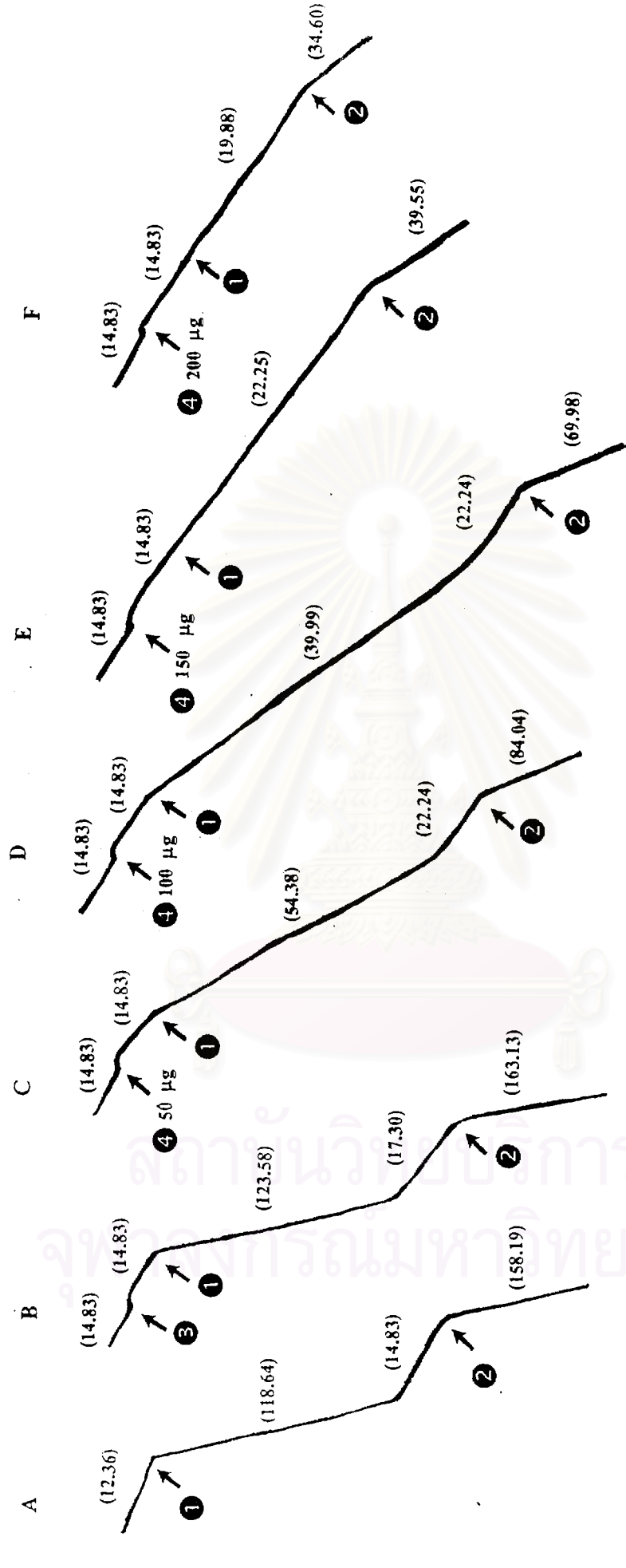
**รูปที่ 24 Tracing แสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50,100,150,200  $\mu\text{g}$  ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นตัวตั้งตรง**

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.62 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ สาร CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

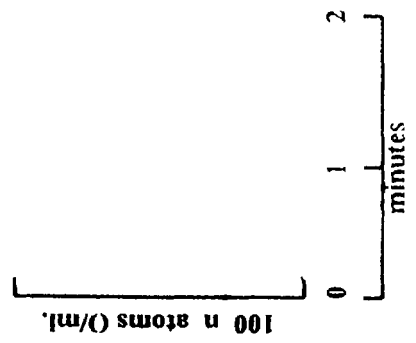
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





- 1 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi
- 2 0.06 mM DNP
- 3 10 µl DMSO
- 4 CU-763-15-13

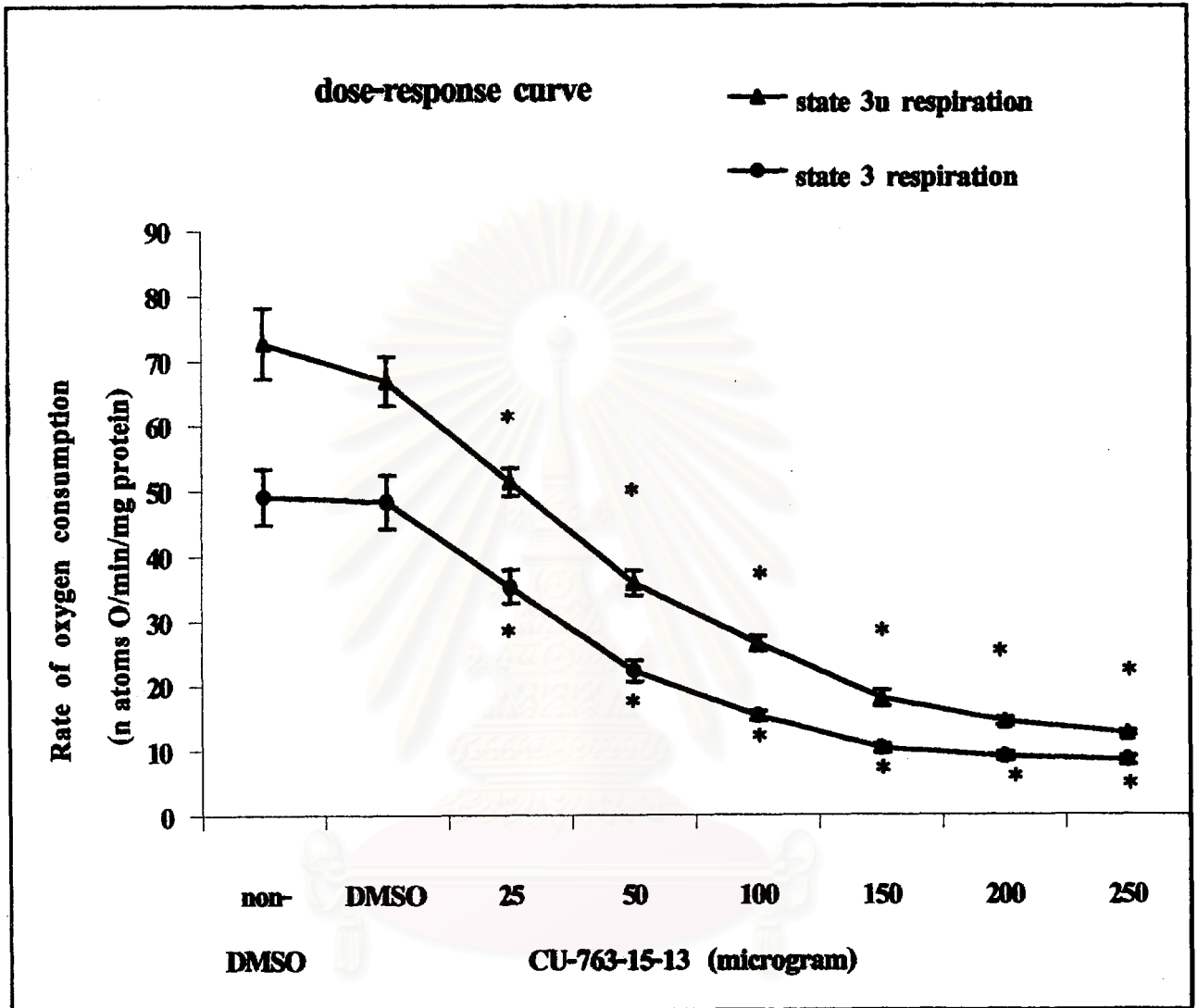


รูปที่ 25 Dose-response curve ของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณต่างๆที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นตัวสเตรท (A) และเมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (% Respiration) (B)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.62 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ สาร CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณต่างๆที่เติมลงไปในรูปแบบ ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

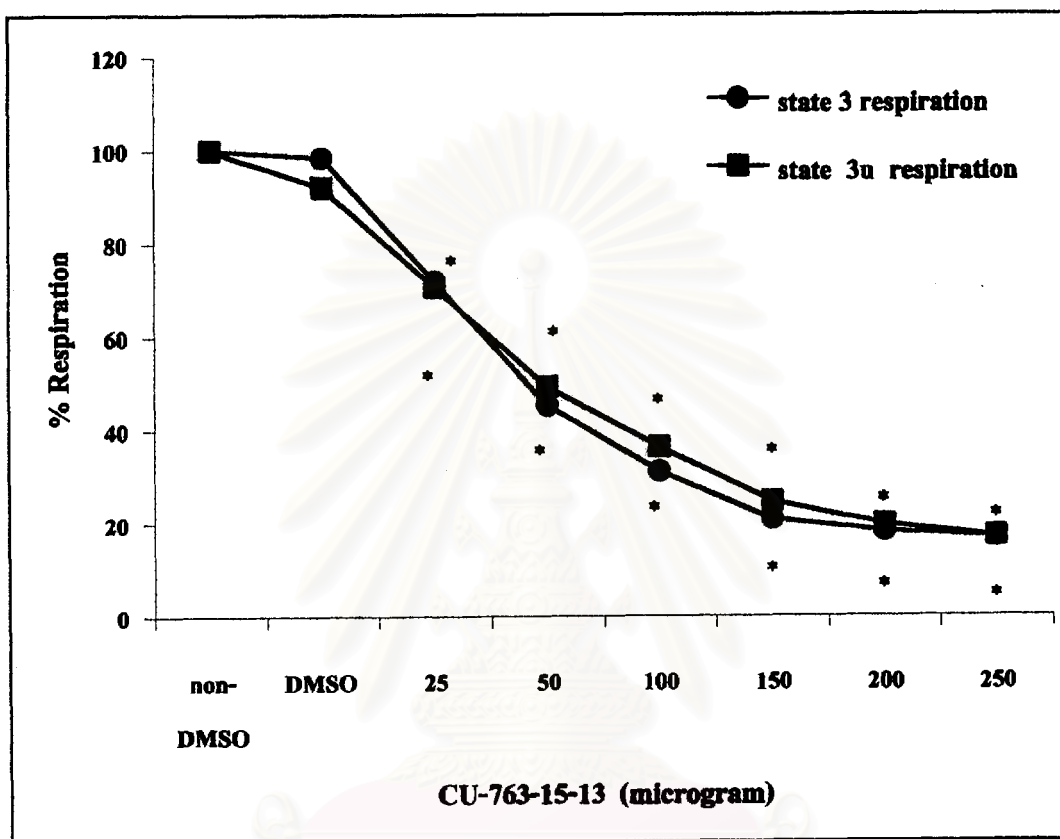
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง  
 $n = 4$  (\*)  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A



B

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

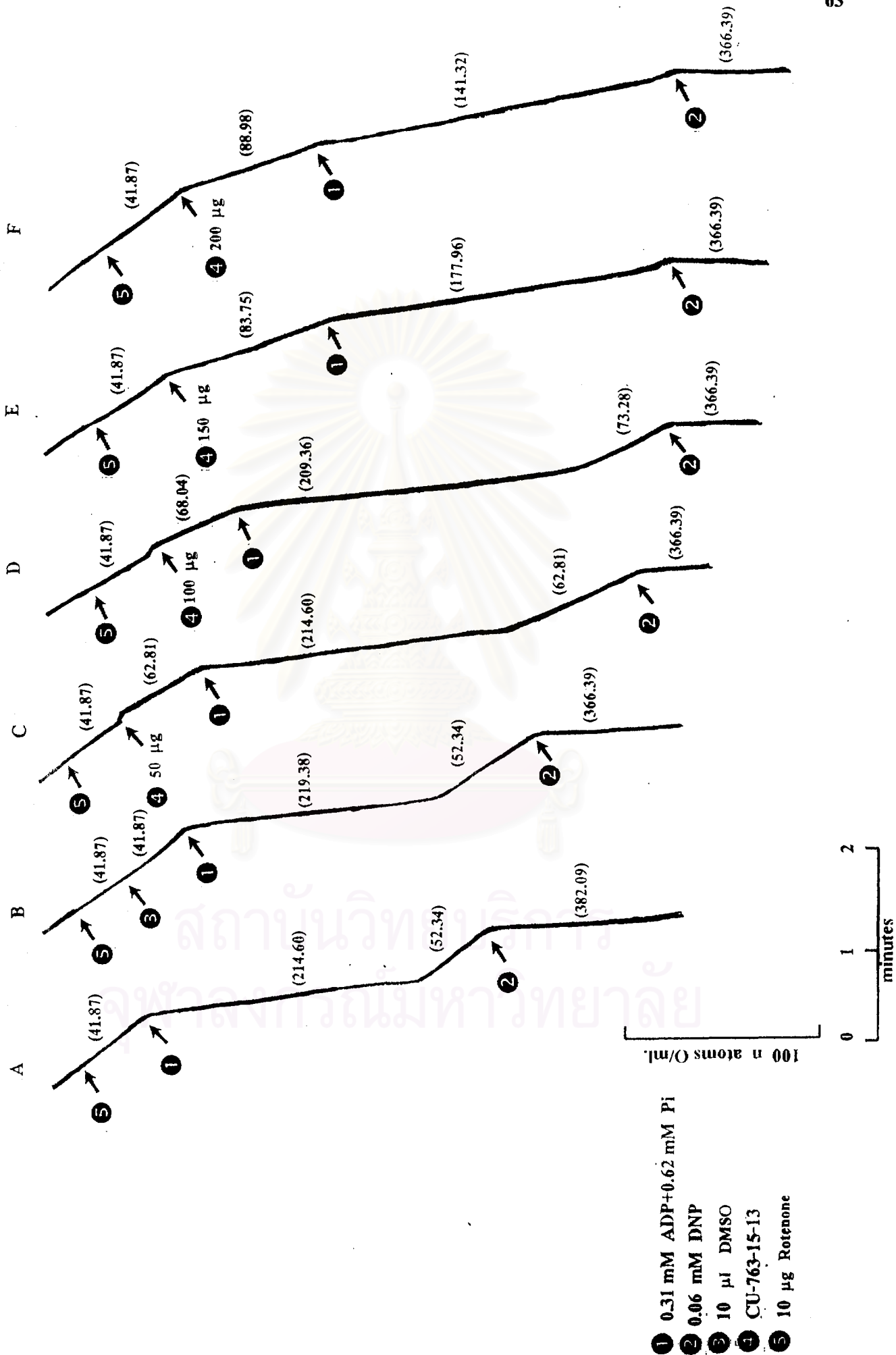
**รูปที่ 26 Tracing แสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท**

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.23 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และสาร CU-763-15-13 ในปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

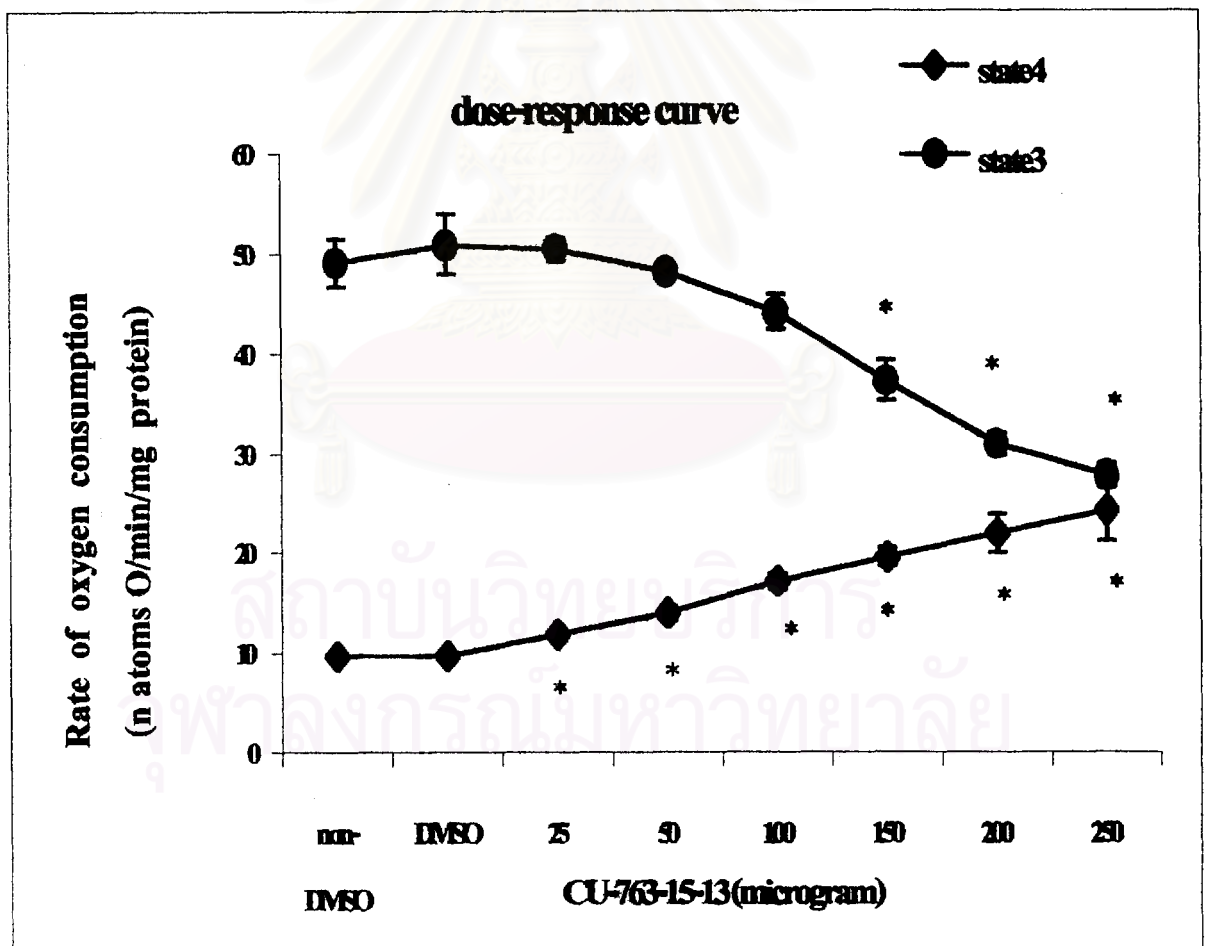




รูปที่ 27 Dose-response curve ของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณต่างๆที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl<sub>2</sub>, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.23 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ สาร CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณต่างๆ ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง n = 4 (\*) p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ตารางที่ 4 ผลของ CU-763-15-13 ต่อค่าดัชนีความกวมการหายใจ (RCI), อัตราส่วน P/O และต่อ state 3 และ state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นตัวตั้งตรง

Experiments	RCI	P / O	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg Protein)	
			State 3	State 3u
Non-DMSO	6.44±0.19	2.85±0.16	49.05±4.33	72.72±5.46
10 µl DMSO (control)	6.23±0.32	2.82±0.17	48.28±4.09	66.89±3.73
50 µg CU-763-15-13	2.75±0.39*	2.19±0.10*	22.19±1.64*	35.84±1.91*
100µg CU-763-15-13	2.27±0.33*	1.88±0.12*	15.29±0.74*	26.46±1.16*
150µg CU-763-15-13	1.88±0.48*	0*	10.21±17.98*	17.98±1.21*
200µg CU-763-15-13	1.38±0.49*	0*	8.92±0.59*	14.34±0.59*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl<sub>2</sub>, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.62 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคงแสดงในรูปคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ สาร CU-763-15-13 ในปริมาณ 50, 100, 150, 200 µg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 µl ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

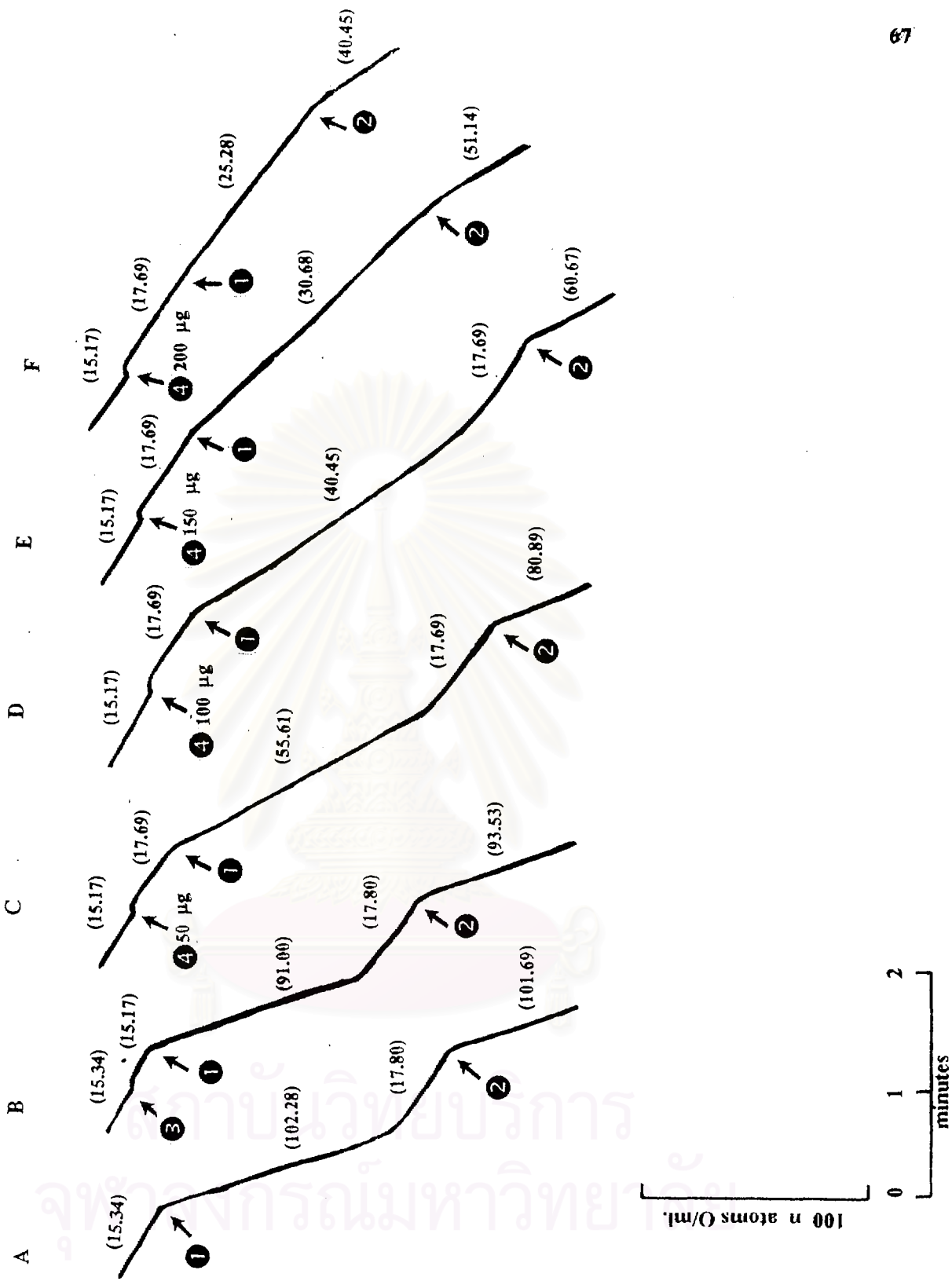
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง  
n = 4 (\*) p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

**รูปที่ 28 Tracing แสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ที่มีต่อ อัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\alpha$ -ketoglutarate เป็นสับสเตรท**

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.62 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ สาร CU-763-15-13 ในปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- 1 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi
- 2 0.06 mM DNP
- 3 10 µl DMSO
- 4 CU-763-15-13



ตารางที่ 5 แสดงผลของ CU-763-15-13 ต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\alpha$ -ketoglutarate เป็นตัวสเตรท (Mean $\pm$ SE)

Experiments	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)	
	State 3	State 3u
Non-DMSO	37.39 $\pm$ 3.12	40.19 $\pm$ 3.00
DMSO (control)	35.78 $\pm$ 2.31	37.34 $\pm$ 2.50
50 $\mu$ g CU-763-15-13	20.81 $\pm$ 0.98*	31.40 $\pm$ 1.81*
100 $\mu$ g CU-763-15-13	14.73 $\pm$ 0.47*	21.82 $\pm$ 1.38*
150 $\mu$ g CU-763-15-13	11.55 $\pm$ 0.07*	18.68 $\pm$ 0.35*
200 $\mu$ g CU-763-15-13	9.75 $\pm$ 0.023*	15.56 $\pm$ 0.53*

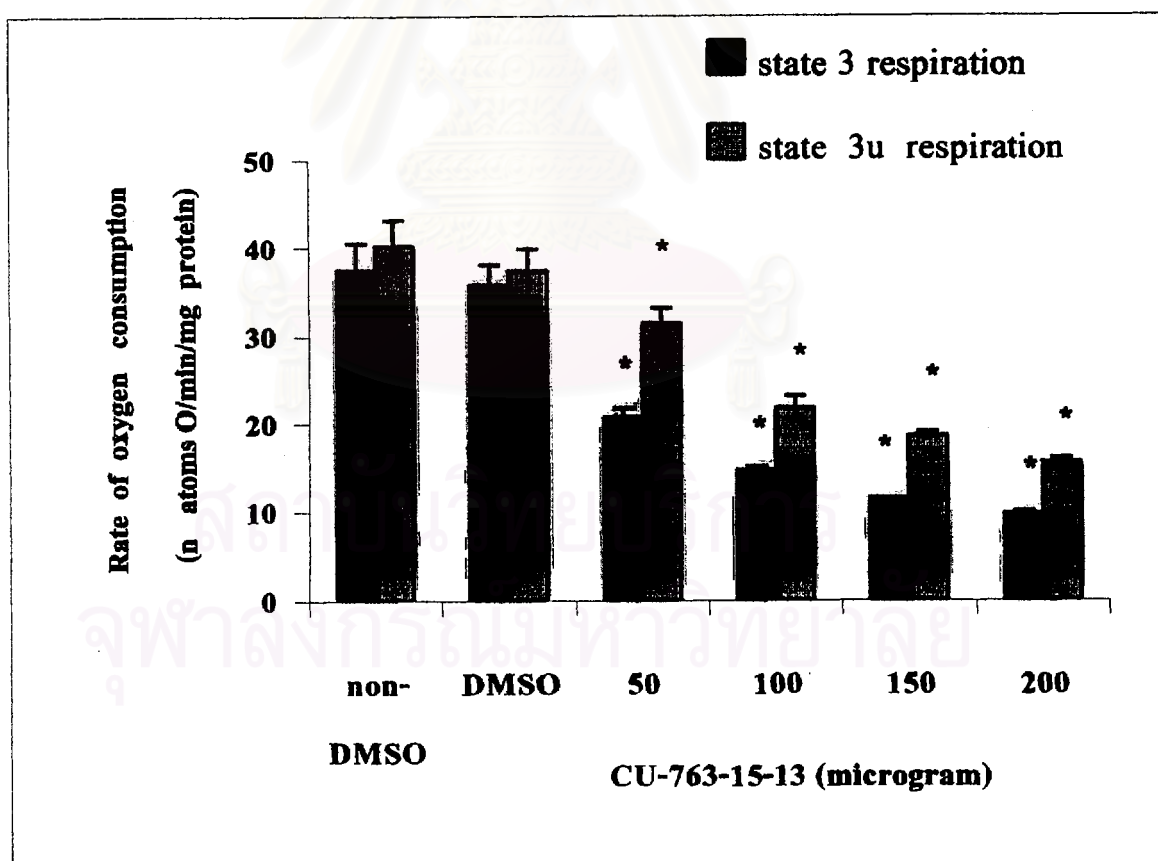
n = 4 (\*) p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**รูปที่ 29** กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\alpha$ -ketoglutarate เป็นตัวสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.56 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เดิมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ สาร CU-763-15-13 ในปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง  
n = 4 (\*)  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control



**รูปที่ 30 Tracing แสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ที่มีต่อ อัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\beta$ -hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท**

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM  $\text{KCl}$ , 5.21 mM  $\beta$ -hydroxybutyrate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.62 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.31 mM  $\text{ADP} + 0.62$  mM  $\text{Pi}$ , 0.06 mM  $\text{DNP}$  และสาร CU-763-15-13 ในปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้  $\text{DMSO}$  10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms  $\text{O}/\text{ml}/\text{min}$

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 6 แสดงผลของ CU-763-15-13 ต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\beta$ -hydroxybutyrate เป็นตัวสเตรก (Mean $\pm$ SE)

Experiments	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)	
	State 3	State 3u
Non-DMSO	31.26 $\pm$ 3.20	37.99 $\pm$ 2.90
DMSO(control)	31.26 $\pm$ 3.20	36.88 $\pm$ 2.88
50 $\mu$ g CU-763-15-13	15.16 $\pm$ 0.21*	24.53 $\pm$ 0.76*
100 $\mu$ g CU-763-15-13	11.39 $\pm$ 0.12*	20.44 $\pm$ 0.99*
150 $\mu$ g CU-763-15-13	7.9 $\pm$ 0.55*	14.20 $\pm$ 0.59*
200 $\mu$ g CU-763-15-13	6.81 $\pm$ 0.64*	11.36 $\pm$ 0.38*

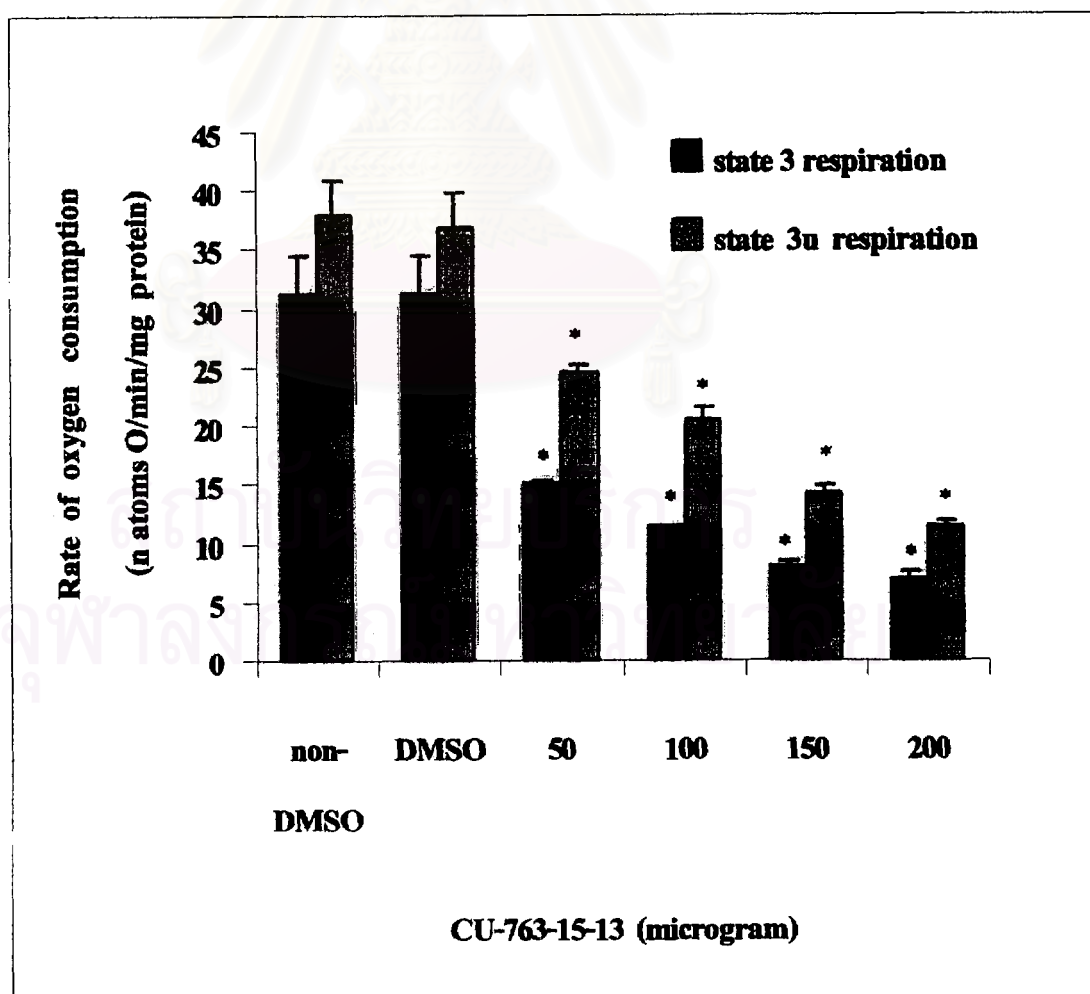
n = 4 (\*) p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



**รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\beta$ -hydroxybutyrate เป็นตัวสเตรท**

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM  $\beta$ -hydroxybutyrate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.56 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และสาร CU-763-15-13 ในปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง n = 4 (\*) p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



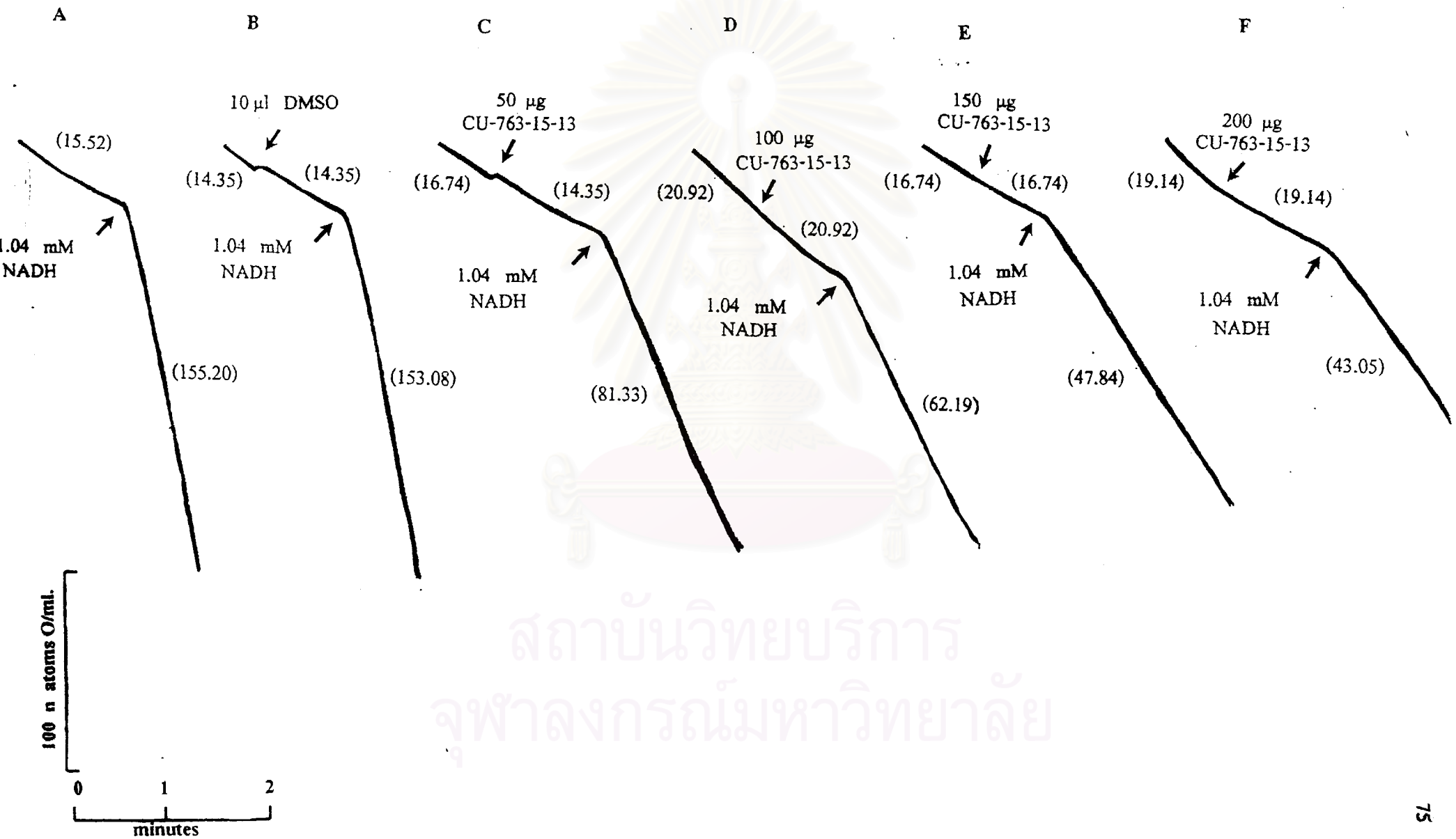
รูปที่ 32 Tracing แสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ที่มีต่อ state 3 u respiration ของ osmotic – shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH เป็นตัวสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 1.04 Mm NADH, 0.52 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรีย 2.19 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูปคือ สาร CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

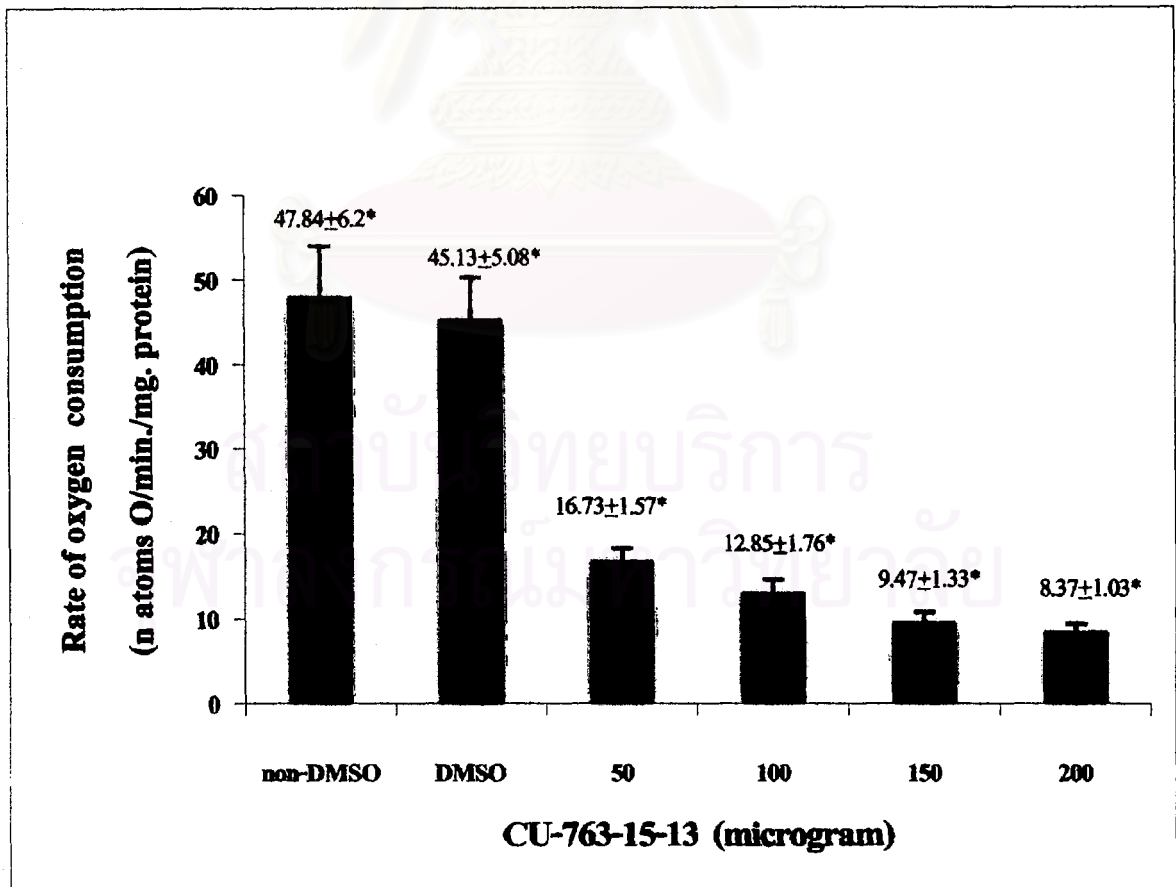


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**รูปที่ 33** กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ที่มีต่อ state 3 u respiration ของ osmotic – shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH เป็น สับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 1.04 Mm NADH, 0.52 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.38 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไป อีกดังแสดงในรูปคือ สาร CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

แต่ละจุดที่แสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง n = 4 (\*) p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ตารางที่ 7 ผลของ rotenone ที่มีผลในการออกฤทธิ์ร่วมกับ CU-763-15-13 ในปริมาณ 50 และ 100  $\mu\text{g}$  ที่มีผลยับยั้งอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 3 และ state 3u เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นตัวสเตรท

Experiments	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)	
	State 3	State 3u
Non-DMSO	53.41 $\pm$ 7.40	72.55 $\pm$ 11.89
DMSO	54.48 $\pm$ 8.14	73.43 $\pm$ 11.22
20 ng Rotenone	32.86 $\pm$ 5.10	43.02 $\pm$ 6.31
50 $\mu\text{g}$ CU-763-15-13	25.54 $\pm$ 3.49	40.66 $\pm$ 6.30
50 $\mu\text{g}$ CU-763-15-13 + 20ng Rotenone	12.67 $\pm$ 1.36	22.01 $\pm$ 3.10
100 $\mu\text{g}$ CU-763-15-13	16.86 $\pm$ 2.47	30.25 $\pm$ 4.59
100 $\mu\text{g}$ CU-763-15-13 + 20 ng Rotenone	8.69 $\pm$ 1.31	15.24 $\pm$ 2.44

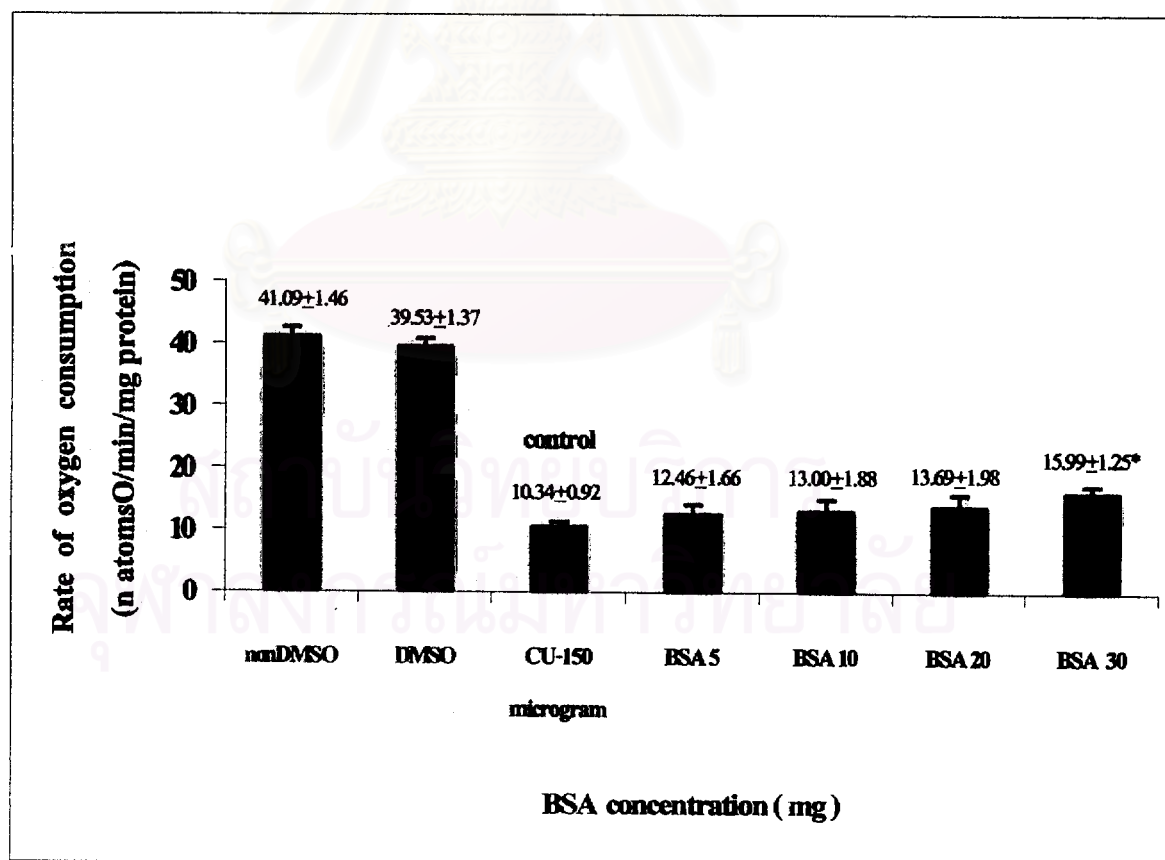
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.59 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP, rotenone ขนาดปริมาณ 20 ng และ สาร CU-763-15-13 ขนาดปริมาณ 50 $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  ที่เติมลงไปในตาราง ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 34 กราฟแสดงผลของ Bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 150  $\mu\text{g}$  ต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+ malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.37 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP, BSA ขนาดปริมาณ 5, 10, 20, 30 mg และ สาร CU-763-15-13 ปริมาณ 150  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง n = 4 (\*)  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control



รูปที่ 35 Tracing แสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 150  $\mu\text{g}$  ต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.14 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP, 1.05 mM DTT และ สาร CU-763-15-13 ปริมาณ 150  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

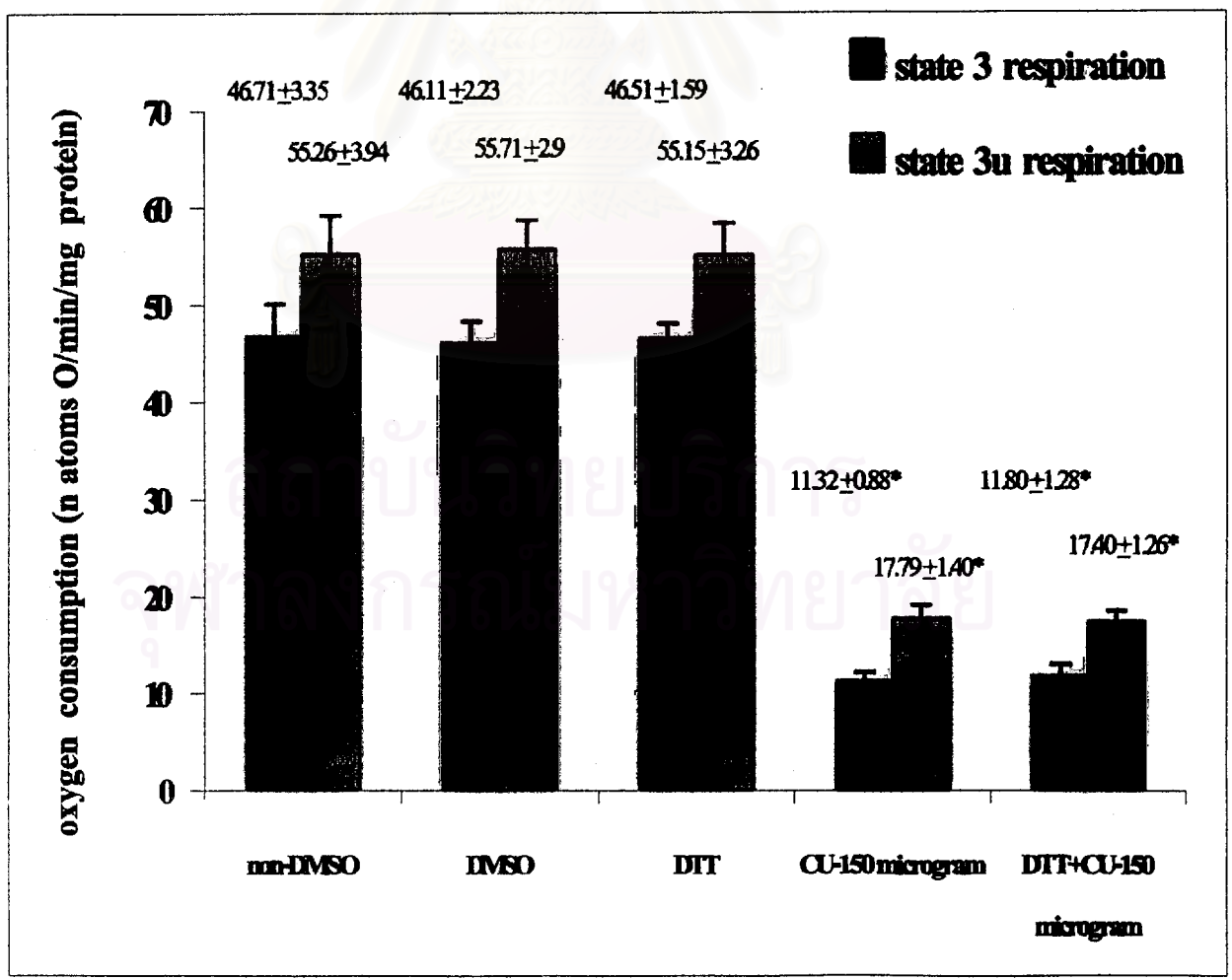




รูปที่ 36 กราฟแสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 150  $\mu$ g ต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.37 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.06 mM DNP, 1.05 mM DTT และ สาร CU-763-15-13 ปริมาณ 150  $\mu$ g ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

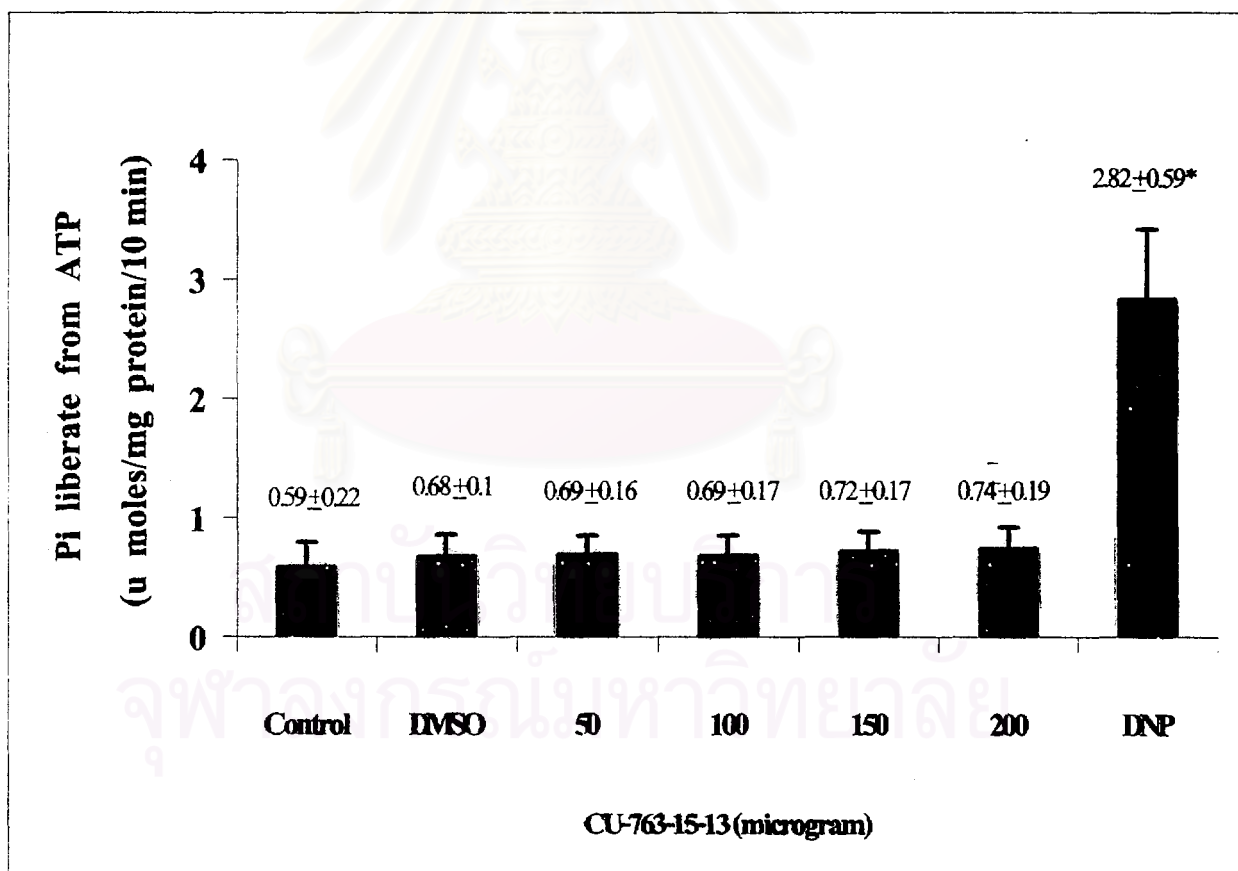
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง n = 4 (\*) p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



รูปที่ 37 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณต่างๆที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 16.78 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.4 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 5.03 mM ATP และ สาร CU-763-15-13 ขนาดปริมาณต่างๆที่เติมลงไปดังแสดงในรูป ปริมาตรทั้งหมด 2.98 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง n = 4 (\*)  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

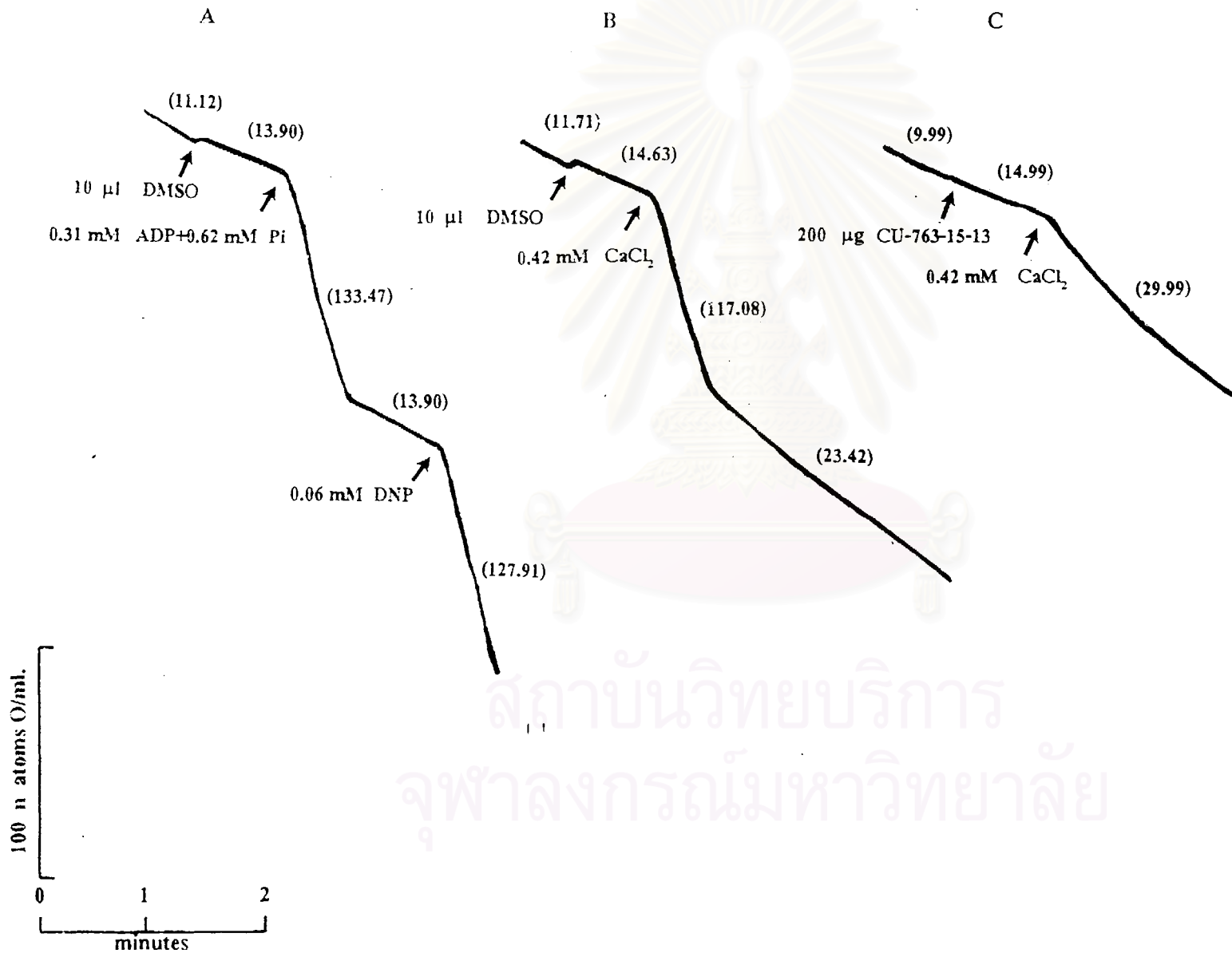


รูปที่ 38 Tracing แสดงผลของ CU-763-15-13 ในปริมาณ 150  $\mu\text{g}$  ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate+ malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.94 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.14 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.42 mM  $\text{CaCl}_2$  และ สาร CU-763-15-13 ปริมาณ 150  $\mu\text{g}$  ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

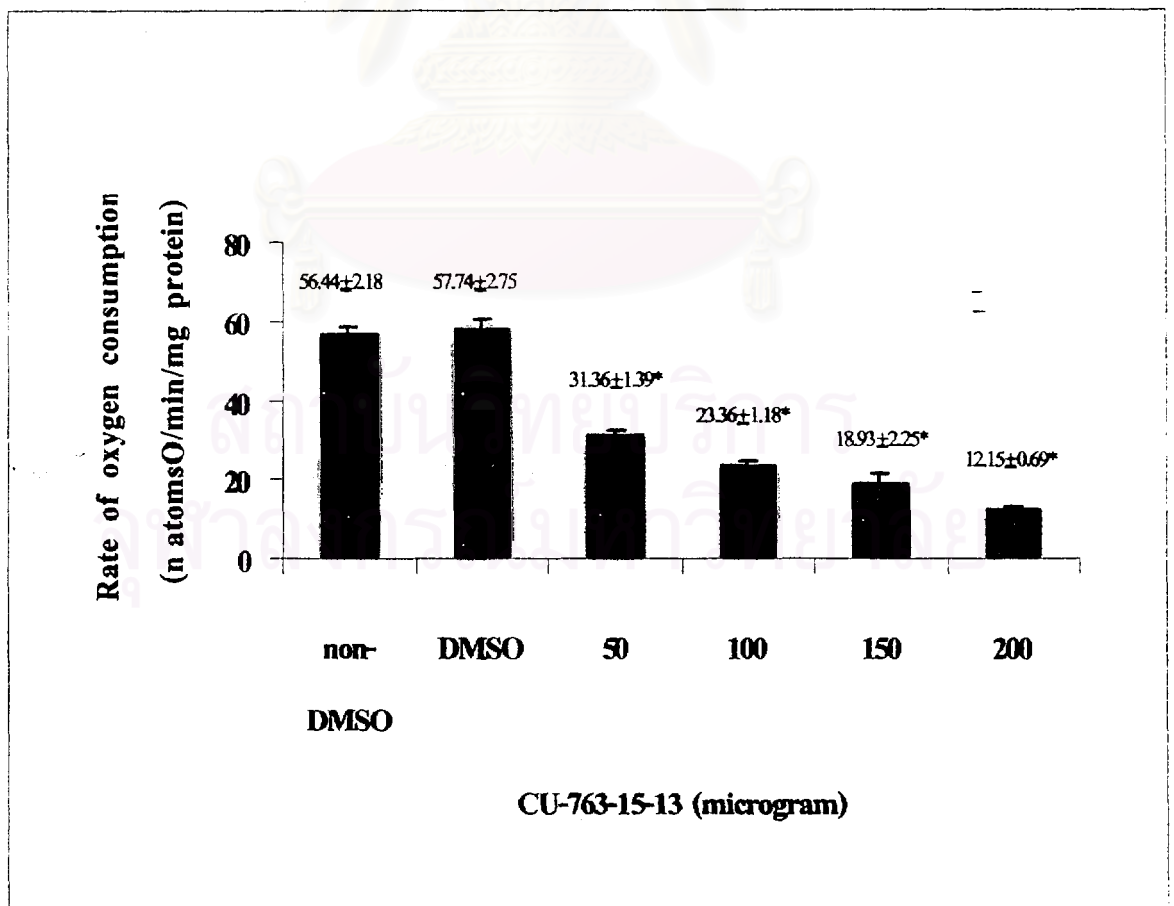


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 39 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$  ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate+ malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $\text{MgCl}_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.94 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.37 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.42 mM  $\text{CaCl}_2$  และ สาร CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณต่างๆ ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$  ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง n = 4 (\*)  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control



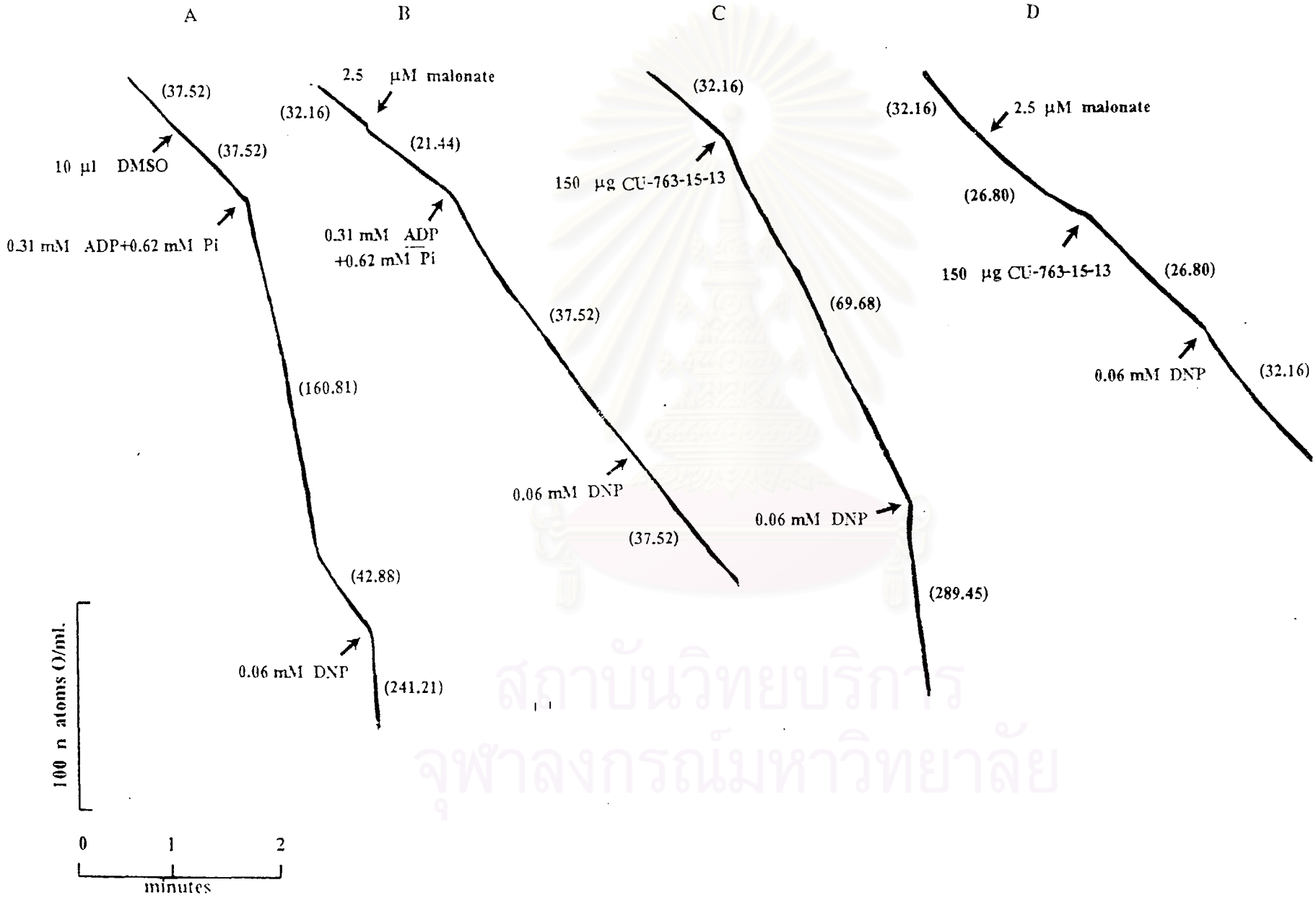
**รูปที่ 40 Tracing แสดงผลของ Malonate (succinate dehydrogenase inhibitor) ต่อการออก  
ฤทธิ์ของ CU-763-15-13 เมื่อใช้ succinate เป็นตัวสแตรท**

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 2.23 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไป  
อีกดังแสดงในรูปคือ 2.5  $\mu$ M malonate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.06 mM DNP และสาร  
CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 150  $\mu$ g ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml  
อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมา  
หน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

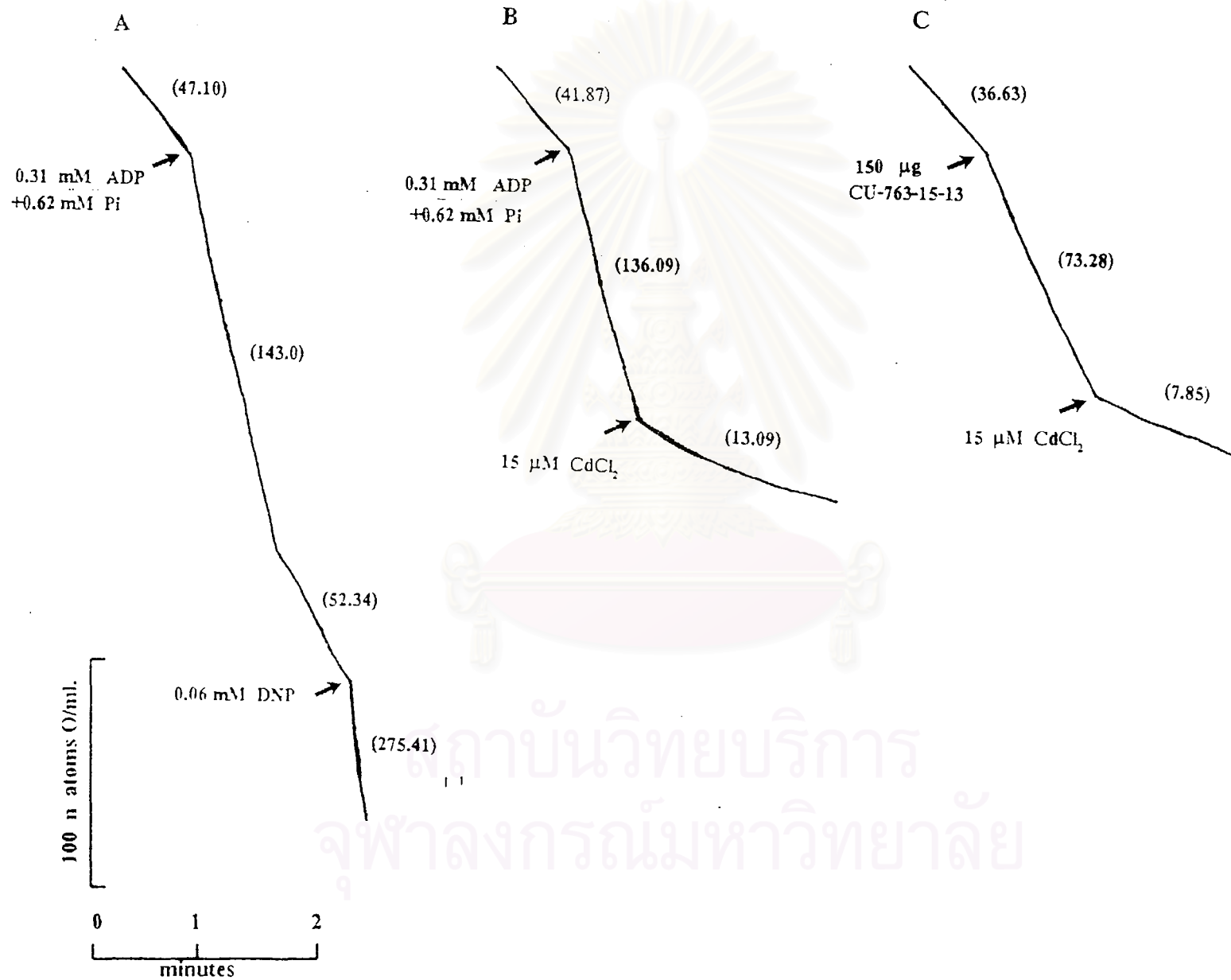
**รูปที่ 41 Tracing แสดงผลของแคดเมียม ( $Cd^{2+}$ ) [succinate oxidation inhibitor] ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-15-13 เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท**

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.23 mg protein/ml ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 10.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 15  $\mu$ M  $CdCl_2$  และ สาร CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณ 150  $\mu$ g ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37  $^{\circ}$ C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

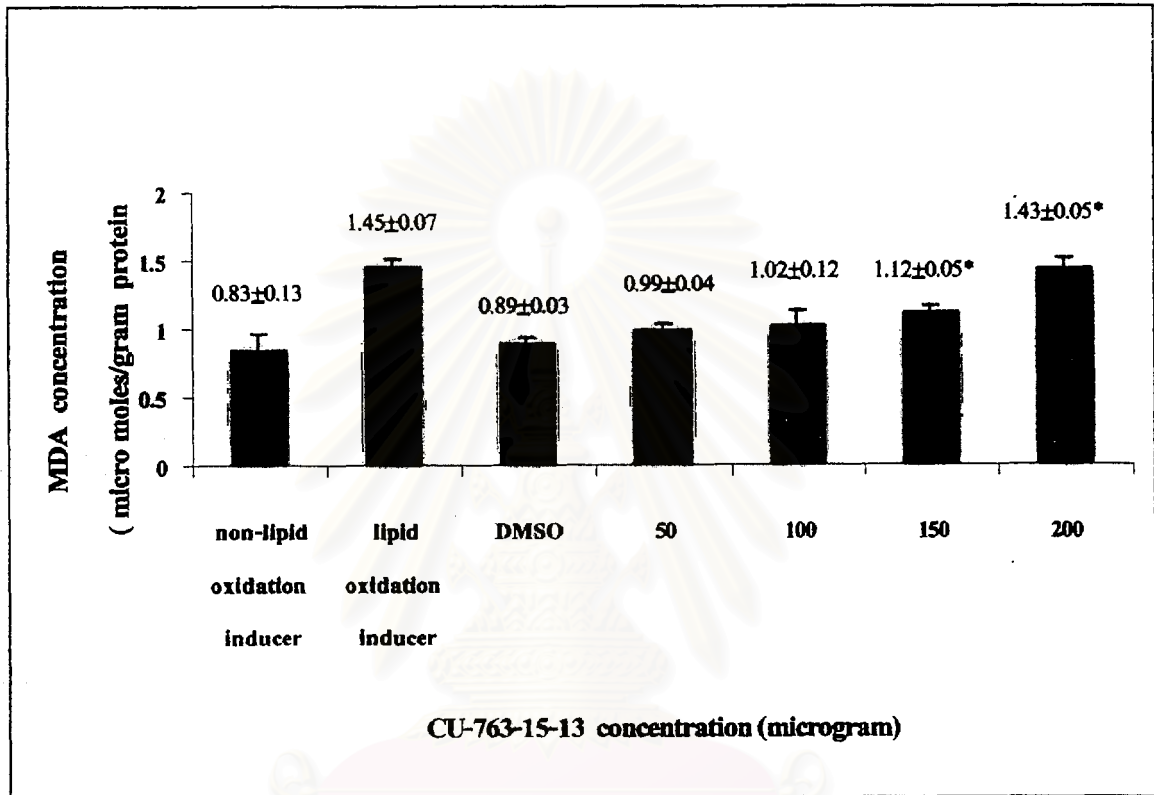


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 42 กราฟแสดงผลของ CU-763-15-13 ต่อการเกิด Lipid peroxidation



ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 2 mM ADP, 0.1 mM  $\text{FeCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  rotenone, 0.1 mM NADH และ สาร CU-763-15-13 ในขนาดปริมาณต่างๆดังรูป มีsubmitochondria 2.84 mg protein ส่วนในกลุ่มควบคุมจะใช้ 10  $\mu\text{l}$  DMSO โดยปริมาตรทั้งหมด 1 ml ซึ่งปล่อยให้ไวให้เกิดปฏิกิริยา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  แล้วจึงนำมาวัดหา lipid peroxidation โดยนำมาทำปฏิกิริยากับ 3 ml TCA-TBA-HCl reagent (15% w/v trichloroacetic acid; 0.375 % thiobarbituric acid ; 0.25 N HCl)

ค่าที่ได้คือ ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งได้มาจากการคำนวณจากค่า extinction coefficient  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$