บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลของเจมไฟโปรซิล (gemfibrozil) ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

1.1 ผลของ gemfibrozil ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน states ต่าง ๆ ของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 16 A แสดงถึงอัตราการใช้ออกซิเจนตามปกติของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง (control) โดยตัวเลขในวงเล็บบ่งชี้อัตราการใช้ออกซิเจนใน states ต่าง ๆ ของไมโตคอนเดรีย มีหน่วยเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที ขณะเริ่มทดลองจะมีไมโตคอนเดรีย incubate อยู่ใน incubation medium ที่มี substrate มากเกินพอซึ่งในที่นี้ใช้ glutamate + malate เป็น substrate การหายใจระยะเริ่มแรกของไมโตคอนเดรียที่เกิดขึ้นนี้มีอัตราการใช้ออกซิเจนต่ำ เรียก state 4 respiration จากนั้นเมื่อเติม ADP + Pi ลงไป ไมโตคอนเดรียจะเกิดการสร้าง ATP ขึ้นทำให้การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีอัตราเร็วเพิ่มขึ้น เรียกการหายใจภาวะนี้ว่า state 3 respiration เมื่อปริมาณ ADP + Pi ที่เติมลงไปถูกนำไปใช้สร้าง ATP หมด ภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรียจะกลับสู่ state 4 อีกครั้งหนึ่ง เราสามารถหาค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ได้โดยนำอัตราการหายใจของ state 3 หารด้วยอัตราการหายใจของ state 4 และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler ลงไป ไมโตคอนเดรียจะเกิดการใช้ออกซิเจน แต่ไม่เกิดการสร้าง ATP การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่

เกิดจากการกระตุ้นโดย DNP นี้จะมีอัตราเร็วสูงกว่า state 3 respiration เราเรียกการหายใจของไมโตคอนเดรียขณะเกิดภาวะ uncoupling นี้ว่า state 3u respiration และไมโตคอนเดรียจะใช้ออกซิเจนใน reaction chamber จนหมด ($O_2 \simeq 0$)

รูปที่ 16 B และ 16 C แสดงผลของ gemfibrozil ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย จะเห็นว่า gemfibrozil สามารถกระตุ้นการหายใจใน state 4 ได้ลักษณะการกระตุ้นแบบนี้คล้ายคลึงกับผลของ DNP ในการกระตุ้นการการหายใจของไมโตคอนเดรีย ความแรงของการตอบสนองต่อการกระตุ้นแปรผันตามความเข้มข้นของ gemfibrozil ที่เติมลงไป โดยเมื่อใช้ 60 µM gemfibrozil จะมีอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เท่ากับ 41.67 นนอ./ออกซิเจน/มล./นาที และถ้าเพิ่มปริมาณ gemfibrozil เป็น 100 µM จะมีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มเป็น 54.44 นนอ./ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อเปรียบเทียบผลของ gemfibrozil สองความเข้มข้นในการกระตุ้นการหายใจใน state 4 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาผลของ gemfibrozil ต่อการหายใจ state 3 และ state 3u พบว่า gemfibrozil ลดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้ง 2 states โดยความแรงของการยับยั้งจะแปรผันตามปริมาณของ gemfibrozil ที่เติมลงไปเช่นกัน

ผลข้างต้นนี้เกิดเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate แต่เมื่อเปลี่ยน substrate เป็น succinate ซึ่งให้ reducing equivalent เข้าที่ complex II ของลูกโซ่การหายใจนั้น ผลวิจัยที่ได้จะแตกต่างกับผลข้างต้น (ดังรูปที่ 18) กล่าวคือเมื่อใช้ succinate เป็น substrate ในการทดลอง gemfibrozil สามารถกระตุ้นการหายใจ state 4 ได้เช่นกัน แต่ผลการยับยั้ง state 3 และ state 3u นั้น ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญ

รูปที่ 17 และรูปที่ 18 แสดง dose-response curve ของ gemfibrozil ขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการหายใจใน state ต่าง ๆ เมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็น substrate ตามลำดับ จะเห็นว่า gemfibrozil สามารถกระตุ้น state 4 respiration ได้ทั้งกรณีที่ใช้ glutamate + malate และใช้ succinate เป็น substrate แต่ผลของ gemfibrozil ในการยับยั้ง state 3 และ state 3u respiration นั้นเกิดเฉพาะเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate เท่านั้น (รูปที่ 17) แต่จะไม่เกิดการยับยั้ง เมื่อใช้ succinate เป็น substrate (รูปที่ 18)

จาก dose-response curve ทั้งสองนี้ทำให้สามารถหาขนาดที่เหมาะสมของ gemfibrozil ที่จะนำมาใช้ทำการทดลองต่อไปได้ โดยในที่นี้เลือกใช้ความเข้มข้น 60 µM และ 100 µM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สอดคล้องกับระดับยาในพลาสมาคน คือ 15-25 มก./ล. ตามลำดับ

1.2 ผลของ gemfibrozil ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราส่วน ADP/O ของไมโตคอนเดรีย (ตารางที่ 6)

1.2.1 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ในที่นี้ตัวทำละลาย gemfibrozil ที่ใช้คือ absolute ethanol ไม่มีผลต่อคุณภาพของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate ค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ที่ได้มีค่าเฉลี่ย 6.89 และ 2.71 ตามลำดับ เมื่อเติม gemfibrozil ความเข้มข้น 10 µM, 60 µM และ 100 µM ลงไป ค่า RCI ลดลงเป็น 6.08, 3.07 และ 2.19 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ามีนัยสำคัญทั้ง 3 ความเข้มข้น ($p < 0.05$) ส่วนค่า ADP/O ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ gemfibrozil ในความเข้มข้น 60 µM ขึ้นไป

1.2.2 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

เช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 absolute ethanol ไม่มีผลต่อคุณภาพของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate ค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ที่ได้มีค่าเฉลี่ย 4.08 และ 1.41 ตามลำดับ เมื่อเติม gemfibrozil ในความเข้มข้น 10 μM, 60 μM และ 100 μM มีผลลดค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ของไมโตคอนเดรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.3 ผลของ gemfibrozil ต่อ state 3u respiration

1.3.1 เมื่อทดลองกับ intact mitochondria

ไมโตคอนเดรียที่ใช้ทดลองนี้เป็น intact mitochondria คือ ไมโตคอนเดรียที่เราเตรียมขึ้นตามวิธีปกติและมีคุณภาพดี ผนังของมันยังคงมีคุณสมบัติเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) substrates ที่ใช้มี 3 ชนิด แต่ละชนิดให้ reducing equivalent เข้าที่ complex ของลูกโซ่การหายใจที่ตำแหน่งต่างๆ กัน substrates ดังกล่าวได้แก่ glutamate + malate ให้ reducing equivalent (NADH) เข้าที่ complex I, succinate ให้ reducing equivalent ($FADH_2$) เข้าที่ complex II และ ascorbate + TMPD ให้ reducing equivalent เข้าที่ complex IV ของลูกโซ่การหายใจ เริ่มแรกเมื่อเติม DNP ลงไปใน chamber ที่มีไมโตคอนเดรีย incubate อยู่ใน incubation medium โดย DNP ทำหน้าที่เป็น uncoupler กระตุ้นการหายใจ state 3u (เกิดภาวะ uncoupling) จนไมโตคอนเดรียใช้ endogenous substrate หมดจึงเติม gemfibrozil ขนาด 60 μM ลงไป incubate นาน 1 นาที แล้วใส่ substrate ให้เกิด state 3u ต่อไปจนปริมาณออกซิเจนใน chamber ลดลงเป็นศูนย์ เปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มควบคุม ซึ่งใช้ absolute ethanol ปริมาตร 3 มคล. แทน gemfibrozil

1.3.1.1 กรณีใช้ glutamate + malate เป็น substrate

จากตารางที่ 7 จะเห็นว่า gemfibrozil ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ของ intact mitochondria เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยลดอัตราการใช้ออกซิเจนเฉลี่ยจากเดิม 106 ± 11.67 เป็น 64.45 ± 20.85 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน

1.3.1.2 กรณีใช้ succinate เป็น substrate

จากตารางที่ 7 ไม่พบว่า gemfibrozil ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u อย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด ($p>0.05$) โดยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจาก 110.03 ± 18.99 เป็น 103.56 ± 19.28 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน

1.3.1.3 กรณีใช้ ascorbate+TMPD เป็น substrate

ข้อมูลในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า gemfibrozil ไม่เปลี่ยนแปลงอัตราใช้ออกซิเจนใน state 3u อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 140.73 ± 19.36 เป็น 141.85 ± 18.86 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน

1.3.2 เมื่อทดลองกับ osmotic-shocked mitochondria

Osmotic-shocked mitochondria คือไมโตคอนเดรียที่ถูกทำให้สูญเสียคุณสมบัติของเยื่อเลือกผ่านและอยู่ในสภาวะ uncoupling โดยการนำไมโตคอนเดรียมา resuspend ใน 0.025 M sucrose ซึ่งเป็น hypotonic กับ ไมโตคอนเดรีย substrate ที่ใช้มี 3 ชนิด เช่นเดียวกับข้อ 1.3.1 แต่เปลี่ยน glutamate + malate เป็น NADH ซึ่งเป็น reducing

equivalent ของ glutamate + malate เองเนื่องจากผนังของ osmotic -shocked mitochondria นี้ยอมให้ NADH ผ่านเข้าได้เลย ขั้นตอนการทดลองเริ่มโดยนำไมโตคอนเดรียมา preincubate กับ gemfibrozil ขนาด 60 µM นาน 1 นาที แล้วจึงเติม substrate ลงไป เพื่อให้เกิด state 3u จนไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนใน chamber หมด เปรียบเทียบผลเช่นเดียวกับ ข้อ 1.3.1

1.3.2.1 กรณีใช้ NADH เป็น substrate

ข้อมูลในตารางที่ 8 จะเห็นว่า gemfibrozil ในขนาด 60 µM สามารถยับยั้ง state 3u ของ osmotic-shocked mitochondria โดยอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 11.12 $\pm$ 0.78 เป็น 7.00 $\pm$ 0.29 นน.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.3.2.2 กรณีใช้ succinate เป็น substrate

ผลวิจัยในตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่า gemfibrozil ไม่ยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3u โดยที่อัตราการใช้ออกซิเจนไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

1.3.2.3 กรณีใช้ ascorbate + TMPD เป็น substrate

ข้อมูลในตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่า gemfibrozil ไม่ยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3u โดยที่อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 43.90 $\pm$ 0.51 เป็น 42.83 $\pm$ 5.14 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน และไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบผลของตารางที่ 7 และตารางที่ 8 จะพบว่า gemfibrozil ยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3u ทั้งใน intact mitochondria และใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ substrate ที่ให้อิเลคตรอนเข้าที่ complex I ของลูกโซ่การหายใจ แต่ gemfibrozil ไม่ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u เมื่อใช้ succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrate ทั้งใน intact mitochondria และ osmotic-shocked mitochondria นอกจากนี้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ของ osmotic-shocked mitochondria ช้ากว่าของ intact mitochondria ซึ่งเกิดทุกกรณีของการใช้ substrate ทั้ง 3 ชนิด

1.4 ผลของ gemfibrozil ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ NAD^+-linked substrates.

1.4.1 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ในรูปที่ 19 tracing A แสดงการหายใจของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุม ซึ่งเติม absolute ethanol 3 มคล. incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาทีก่อนเติม ADP+Pi ส่วน tracing B แสดงการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ incubate กับ 60 µM gemfibrozil จาก tracing B จะเห็นว่าหลังเติม gemfibrozil ลงไปอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เพิ่มขึ้นจาก 23.61 เป็น 34.72 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อ ADP+Pi ลงไป พบว่า gemfibrozil ลดอัตราการหายใจใน state 3 ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) คือ จาก 54.28 ± 2.70 เป็น 34.31 ± 1.75 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน (ตารางที่ 9) เมื่อเติม DNP ลงไปหลังจากที่ไมโตคอนเดรียใช้ ADP+Pi ในการสร้าง ATP จนหมดแล้วพบว่า gemfibrozil ลดอัตราการหายใน state 3u ลงจาก 44.82 ± 1.01 เป็น 15.56 ± 1.26 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน (ตารางที่ 10)

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาผลของ gemfibrozil ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) พบว่า gemfibrozil ลดค่า RCI ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เช่นกัน ดังข้อมูลในตารางที่ 11

1.4.2 เมื่อใช้ β-hydroxybutyrate เป็น substrate

จากรูปที่ 20 tracing A แสดงอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุม ส่วน tracing B เป็นกลุ่มทดลองซึ่งจะเติม 60 μM gemfibrozil ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาที ก่อนเติม ADP+Pi ผลคือ gemfibrozil เพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 จาก 22.22 เป็น 53.61 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที เมื่อพิจารณาผลของ gemfibrozil ต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ 3u พบว่า gemfibrozil ยับยั้งการหายใจในทั้ง 2 states อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังข้อมูลในตารางที่ 9 และ 10 นอกจากนี้ gemfibrozil ยังลดค่า RCI ลงอย่างมีนัยสำคัญจาก 6.09 ± 0.85 เป็น 3.08 ± 0.18 จากตารางที่ 11

1.4.3 เมื่อใช้ α-Ketoglutarate เป็น substrate

จากรูปที่ 21 tracing B ซึ่งแสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 μM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (tracing A) จะเห็นว่าหลังจากเติม gemfibrozil ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรีย นาน 1 นาที พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เพิ่มขึ้นจาก 30.56 เป็น 43.06 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ส่วนผลของ gemfibrozil ต่อ state 3, และ 3u และต่อค่า RCI เมื่อใช้ α-ketoglutarate เป็น substrate นี้สอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 1.4.1 และ 1.4.2 กล่าวคือ gemfibrozil ยับยั้งการหายใจทั้งของ state 3 และ 3u นอกจากนี้ยังมีผลให้ค่า RCI ลดลงอย่างมีนัยสำคัย (ดังข้อมูลในตารางที่ 9, 10 และ 11) เช่นกัน

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า gemfibrozil สามารถยับยั้งการหายใจใน state 3, และ 3u ของไมโตคอนเดรีย และลดค่า RCI เมื่อใช้ NAD^+-linked substrate ทั้ง 3 ชนิดได้

1.5 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการหายใจ states ต่าง ๆ ของไมโตคอนเดรีย

1.5.1 ผลต่อการกระตุ้น state 4 respiration

ตารางที่ 12 แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งไมโตคอนเดรียจะถูก incubate อยู่ใน medium ที่มี pH 6.8, 7.2 และ 7.6 โดยกลุ่มควบคุมเติม absolute ethanol 3 มคล. ส่วนกลุ่มตัวอย่างเติม gemfibrozil ขนาด 60 µM ลงไป incubate นาน 1 นาที แล้วจึงวัดอัตราการใช้ออกซิเจน จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่ได้รับ gemfibrozil จะเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ทุกค่า pH นอกจากนั้นเมื่อคิด % stimulation จะพบว่า gemfibrozil ออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจใน state 4 ที่ pH 6.8 ได้ดีกว่าที่ pH 7.2 และ 7.6

1.5.2 ผลต่อการยับยั้ง state 3 respiration

จากตารางที่ 13 จะเห็นว่า gemfibrozil ขนาด 60 µM มีผลยับยั้งการหายใจ state 3 อย่างมีสำคัญทางสถิติ ($p<0.005$) ทุกค่า pH และเมื่อเปรียบเทียบค่า % inhibition พบว่า gemfibrozil มีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจ state 3 ที่ pH 6.8 ได้มากกว่า pH 7.2 และ 7.6

1.5.3 ผลต่อการยับยั้ง state 3u respiration

ตารางที่ 14 แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 μM ต่อการหายใจ state 3u จะเห็นว่า gemfibrozil มีผลยับยั้งการหายใจ state 3u อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ทุกค่า pH และเมื่อเปรียบเทียบค่า % inhibition พบว่า gemfibrozil มีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจ state 3u ที่ pH 6.8 ได้มากกว่าที่ pH 7.2 และ 7.6

1.6 ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 22 tracing A แสดงการหายใจของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุมซึ่งเติม absolute ethanol 5 มคล. และ BSA 30 มก. ลงไป incubate นาน 1 นาที ก่อนเติม ADP+Pi ส่วน tracing B จะเติม gemfibrozil ขนาด 100 μM หลังจากเติม BSA แล้ว incubate ต่ออีกนาน 1 นาที จึงเติม ADP+Pi จากผลการทดลองดังรูปจะได้ว่า BSA กระตุ้นการหายใจ state 4 เล็กน้อย ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง คือจาก 18.06 เป็น 27.78 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที เมื่อเติม ADP+Pi ลงในกลุ่มควบคุม (ดัง tracing A) พบว่า BSA ในขนาด 30 มก. ไม่รบกวนการสร้าง ATP จาก ADP+Pi หรืออีกนัยหนึ่งไม่รบกวนการหายใจใน state 3 โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 238.89 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ในที่นี้ไม่เติม DNP เพื่อศึกษาผลต่อ state 3u respiration เนื่องจาก DNP สามารถจับกับ BSA ได้ ทำให้ DNP ออกฤทธิ์เป็น uncoupler ได้น้อยลงหรือบางกรณีไม่ออกฤทธิ์เลย

จากรูปที่ 22 tracing B แสดงการเปรียบเทียบผลของการเติม BSA ในขนาดต่าง ๆ คือ 5, 10, 20 และ 30 มก. ต่อการออกฤทธิ์ของ

gemfibrozil ขนาด 100 µM ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย จะได้ว่า BSA มีผลให้ gemfibrozil ออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ลดลง หรืออีกนัยหนึ่ง BSA สามารถ reverse การหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกยับยั้งโดย gemfibrozil ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากรูป 22 tracing B จะเห็นอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ของไมโตคอนเดรียซึ่งเติม gemfibrozil แต่ไม่เติม BSA เท่ากับ 102.78 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที แต่เมื่อเติม BSA ในขนาด 5, 10, 20 และ 30 มก. ลงไปพบว่า BSA ในขนาดเพียง 5 มก. ก็สามารถลดผลการยับยั้ง state 3 respiration โดย gemfibrozil ได้โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มเป็น 127.78 นนอ./ออกซิเจน/มล./นาที ส่วน BSA ขนาด 10 และ 20 มก. ให้ผลในการลดการยับยั้ง state 3 respiration โดย gemfibrozil ได้ใกล้เคียงกับ BSA 5 มก. และยังพบว่า BSA ขนาด 30 มก. ให้ผลมากที่สุด โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 130.00 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที

เมื่อพิจารณาผลของ BSA ขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ในการกระตุ้นการหายใจใน state 4 ซึ่งเกิดหลัง state 3 พบว่า BSA ลดผลของ gemfibrozil ในการกระตุ้นการหายใจ state 4 ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่มี BSA และผลที่ได้จะแปรผันตามขนาดของ BSA ที่เติมลงไป โดย BSA ขนาด 30 มก. ให้ผลลดการกระตุ้นการหายใจ state 4 โดย gemfibrozil ได้มากที่สุด โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 31.94 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ในขณะที่เมื่อไม่มี BSA อัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 61.11 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที

1.7 ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 23 tracing A แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 µM ซึ่งเติมลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาที ก่อนเติม

ADP+Pi จากรูปจะเห็น gemfibrozil ยับยั้งการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรีย โดยอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเหลือ 113.89 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ในขณะที่อัตราการหายใจใน state 3 ของกลุ่มควบคุม เท่ากับ 177.78 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อเติม DNP ลงไป ก็พบว่า gemfibrozil ยับยั้งการหายใจใน state 3u เช่นกัน โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 250.00 เป็น 147.22 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที

DTT เป็นสารที่มีคุณสมบัติป้องกัน sulfhydryl group (-SH) ซึ่งจะถูกเติมลงไป incubate กับไมโตคอนเดรีย นาน 1 นาที ก่อนเติม gemfibrozil จากรูปที่ 23 tracing C DTT มีผลกระตุ้นการหายใจ state 4 เล็กน้อย และไม่ลดผลของ gemfibrozil ในการกระตุ้นการหายใจ state 4

เมื่อพิจารณาอัตราการหายใจ state 3 และ 3u พบว่า DTT ไม่เปลี่ยนแปลงผลของ gemfibrozil ในการยับยั้งการหายใจ state 3 และ 3u แต่อย่างใด โดยเปรียบเทียบระหว่าง tracing B และ C จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เปลี่ยนแปลงจาก 113.89 เป็น 114.17 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที และอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u เปลี่ยนแปลงจาก 147.22 เป็น 150.22 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ผลการทดลองข้างต้นนี้สอดคล้องกับข้อมูลในตารางที่ 15 ซึ่งแสดงผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ในการกระตุ้น state 4 และการยับยั้ง state 3, 3u ด้วย โดยเมื่อเติม DTT และ gemfibrozil แล้ว incubate ต่อ นาน 5 นาที จึงเติม substrate, ADP+Pi และ DNP ตามลงไป แล้ววัดอัตราการหายใจภาวะต่าง ๆ ผลที่ได้คือ DTT ไม่ลดผลของ gemfibrozil ที่มีต่อการหายใจ state 4, 3 และ 3u ของไมโตคอนเดรียอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

2. ผลของ gemfibrozil ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

โดยที่เอนไซม์ ATPase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญของไมโตคอนเดรีย มีหน้าที่สร้างและสลาย ATP ดังนั้นจึงทำการศึกษาดูผลของ gemfibrozil ที่มีต่อ activity ของเอนไซม์นี้ เพื่อใช้เป็นตัวชี้หนึ่งที่บ่งชี้ถึงผลของ gemfibrozil ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย ในการวิจัยนี้วัด activity ของเอนไซม์ ATPase โดยการวัดปริมาณโปรตอนที่เกิดขึ้นหลังเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ผลวิจัยแบ่งออกเป็น 2 กรณี คือกรณีแรกจะกระตุ้นการทำงานของ ATPase โดยการเติม DNP ส่วนกรณีที่สองไม่กระตุ้นด้วย DNP

2.1 ผลของ gemfibrozil ต่อ ATPase activity เมื่อถูกกระตุ้นด้วย DNP

จากผลการทดลองในตารางที่ 16 แสดงให้เห็นว่า absolute ethanol (alcohol) 5 มคล. ไม่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) ซึ่งไม่เติมสารใด ๆ ในขณะทำการทดลอง เมื่อเติม gemfibrozil ลงไปในขนาด 60 µM และ 100 µM พบว่า gemfibrozil มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase (ซึ่งกระตุ้นด้วย DNP) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติม alcohol 5 มคล. แต่ผลของ gemfibrozil ในการยับยั้ง activity ของเอนไซม์ ATPase นี้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติม oligomycin 10 มคก.ลงไป (oligomycin เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase) โดยกลุ่มที่รับ gemfibrozil ขนาด 60 µM และ 100 µM มี ATPase activity เท่ากับ 115.96 ± 8.18 และ 105.68 ± 8.63 นนม. โปรตอน/มก.โปรตีน/ 5 นาที ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่รับ oligomycin มี ATPase activity เพียง 30.20 ± 5.15 นนม.โปรตอน/มก.โปรตีน/ 5 นาที เท่านั้น

นอกจากจะแสดงผลวิจัยในตารางที่ 16 แล้วยังแสดงผลในรูปที่ 24 ซึ่งแสดงผลได้ชัดเจนและสอดคล้องกัน โดยรูปที่ 24 tracing A แสดง ATPase activity ของไมโตคอนเดรียซึ่งเติม alcohol 5 มคล. incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาที ก่อนเติม 4.46 mM ATP ลงไป จะได้ ATPase activity เท่ากับ 900 นนม. โปรตอน/5 นาที และเมื่อเติม gemfibrozil ขนาด 60 μM (tracing B) หรือขนาด 100 μM (tracing C) ลงไปแทน alcohol จะพบว่ามีการยับยั้ง ATPase activity เกิดขึ้น แต่จัดว่าน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับผลของ oligomycin ซึ่งลด ATPase activity เหลือเพียง 226 นนม. โปรตอน/5 นาที

2.2 ผลของ gemfibrozil ต่อ ATPase activity เมื่อไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

จากผลการวิจัยในตารางที่ 16 แสดงว่า gemfibrozil ทั้งขนาด 60 μM และ 100 μM มีผลกระตุ้น activity ของเอนไซม์ ATPase อย่างนัยสำคัญ ($P<0.05$) และความแรงในการกระตุ้นแปรผันตามขนาดของ gemfibrozil ที่เติมลงไป

3. ผลของ gemfibrozil ที่มีต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมโดยไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากพลังงานส่วนหนึ่งที่ได้จากการหายใจของไมโตคอนเดรีย ถูกนำไปใช้ในกระบวนการขนส่งอิออน เช่น แคลเซียมอิออนเข้า-ออก จากไมโตคอนเดรีย การทดลองนี้มุ่งศึกษาผลของ gemfibrozil ที่มีต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียม เพื่อนำผลที่ได้เป็นดัชนีอันหนึ่งในการบ่งชี้ผลของ gemfibrozil ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย โดยแบ่งผลการวิจัยออกเป็น 2 หัวข้อดังนี้

3.1 ผลของ gemfibrozil ต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

จากรูปที่ 25 tracing D แสดงการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุม จะเห็นว่าระดับแคลเซียมใน medium จะสูงขึ้นทันทีหลังจากเติม $CaCl_2$ และเมื่อเติมไมโตคอนเดรีย (RLM) ลงไป ไมโตคอนเดรียจะขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมอย่างรวดเร็ว ส่วน tracing A แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 μM ซึ่งเติมลงใน medium ก่อนเติม $CaCl_2$ นานประมาณ 2 นาทีและเมื่อเติมไมโตคอนเดรียลงไป จะพบว่าไมโตคอนเดรียมีการสะสมแคลเซียมเข้าไปไว้ในตัวมันอย่างรวดเร็ว จนปริมาณแคลเซียมใน medium ลดลงเกือบเท่ากลุ่มควบคุม จากนั้นจะเกิดการปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็วและเกือบทันที แสดงว่า gemfibrozil มีผลกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโตคอนเดรีย

ในรูปที่ 25 tracing B และ C แสดงการเปรียบเทียบผลของ DNP กับ gemfibrozil ที่มีต่อการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโตคอนเดรียตามลำดับ โดยการให้ไมโตคอนเดรียสะสมแคลเซียมเข้าไปนาน 5 นาที จากนั้นจึงเติม DNP หรือ gemfibrozil ลงไป ผลที่ได้ คือ ทั้ง DNP และ gemfibrozil ให้ผลเหมือนกัน คือ กระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโตคอนเดรีย และเมื่อพิจารณาอัตราเร็วของ tracing ทั้งสอง พบว่า DNP กระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมได้เร็วกว่า gemfibrozil

3.2 ผลของ gemfibrozil ต่อการสะสม และการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็น substrate

จากรูปที่ 26 tracing D แสดงการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่เติมสารใดลงไปใน medium จะเห็นว่าระดับแคลเซียมใน medium ลดลงอย่างรวดเร็วทันทีที่เติมไมโตคอนเดรีย (RLM) ลง

ไป แสดงว่าไมโตคอนเดรียมีการสะสมแคลเซียมเข้าไปไว้ในตัวจนปริมาณแคลเซียมใน medium ลดลงจนต่ำสุดและคงที่แม้เวลาผ่านไปนานกว่า 10 นาที ก็ตาม ใน tracing A ของรูปที่ 26 แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 μM ต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียม ซึ่งจะเห็นว่า gemfibrozil มีผลกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโตคอนเดรียทันที หลังจากที่ไมโตคอนเดรียสะสมแคลเซียมแล้ว ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลในข้อ 3.1 (รูปที่ 25 tracing A)

จากรูปที่ 26 tracing B และ C แสดงการเปรียบเทียบผลของ DNP และ gemfibrozil ขนาด 60 μM ที่มีต่อการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโตคอนเดรียตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลในข้อ 3.1 (tracing B และ C) คือทั้ง DNP และ gemfibrozil กระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโตคอนเดรียทันที หลังจากที่ไมโตคอนเดรียสะสมแคลเซียมเข้าไปไว้ในตัวนาน 5 นาที

จากผลในข้อ 3.1 และข้อ 3.2 แสดงให้เห็นว่า gemfibrozil มีผลกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโตคอนเดรียอย่างรวดเร็ว ทั้งในกรณีที่ใช้ glutamate + malate และ succinate เป็น substrates

4. ผลของ gemfibrozil ที่มีต่อ activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) ของไมโตคอนเดรีย

การทดลองนี้ศึกษาผลของ gemfibrozil ต่อ activity ของเอนไซม์ MAO ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย ในที่นี้ใช้ benzylamine เป็น monoamine substrate และมี rotenone ทำหน้าที่เป็น respiratory chain inhibitor ซึ่งจะยับยั้งการออกซิไดส์ endogenous substrates ของไมโตคอนเดรีย เพื่อให้สามารถแปรผลได้ว่าการใช้ออกซิเจนที่เกิดขึ้นเกิดจากการออกซิไดส์ benzylamine โดย MAO เท่านั้น

รูปที่ 27 tracing A แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุมซึ่งเติม alcohol 5 มคล. ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาทีก่อนเติม benzylamine จะเห็นว่าไมโตคอนเดรียมีการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดส์ benzylamine เท่ากับ 30.83 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ส่วน tracing B และ C ซึ่งเติม gemfibrozil ขนาด 60 µM และ 100 µM แทน alcohol ตามลำดับ จะเห็นว่าไม่มีผลกระตุ้นหรือยับยั้งการออกซิไดส์ benzylamine แต่อย่างใดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับข้อมูลในตารางที่ 17 ซึ่งแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุมมีค่า 6.382 $\pm$ 0.725 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน ส่วนกลุ่มที่เติม gemfibrozil ขนาด 60 µM และ 100 µM มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 6.212 $\pm$ 0.562 และ 6.175 $\pm$ 0.661 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ

ในรูปที่ 27 tracing D แสดงการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดส์ benzylamine ของไมโตคอนเดรียเมื่อเติม pargyline ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ MAO ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรีย นาน 1 นาที ก่อนเติม benzylamine จากผลการทดลองจะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนหลังเติม benzylamine ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงว่าการออกซิไดส์ benzylamine โดยเอนไซม์ MAO ถูกยับยั้งโดย pargyline ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับข้อมูลในตารางที่ 17 ซึ่งพิจารณาเฉพาะกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติม pargyline จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของกลุ่มควบคุมมีค่า 6.382$\pm$0.725 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน ส่วนกลุ่มที่เติม pargyline มีอัตราการใช้ออกซิเจน เท่ากับ 0.997 $\pm$ 0.09 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน ซึ่งจัดว่าน้อยมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบผลของ gemfibrozil และ pargyline ต่อ activity ของเอนไซม์ MAO จะได้ว่า gemfibrozil ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO

5. การเปรียบเทียบผลของ gemfibrozil กับ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

เนื่องจาก gemfibrozil จัดเป็นยาในกลุ่มอนุพันธ์ของกรดไฟบริก (fibric acid) เช่นเดียวกับ clofibrate ซึ่งเป็น prototype ของยากลุ่มนี้ จึงได้ทำการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบผลของยาทั้งสองที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินว่ากลไกการออกฤทธิ์ของยาทั้งสองเกี่ยวข้องกับการมีสูตรโครงสร้างสัมพันธ์กันหรือไม่, อย่างไร ในที่นี้ใช้ clofibric acid ซึ่งเป็น active form แทน clofibrate

จากรูปที่ 28 tracing A แสดงการหายใจของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุมซึ่งเติม alcohol 10 มคล. incubate กับไมโตคอนเดรีย นาน 1 นาที ก่อนเติม ADP + Pi ส่วน tracing B แสดงการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อเติม gemfibrozil ขนาด 100 µM จะเห็นว่าอัตราการหายใจใน state 4 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับของกลุ่มควบคุม คือ จาก 36.11 เป็น 66.67 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที อัตราการหายใจใน state 3 ลดลงเมื่อเทียบกับของกลุ่มควบคุมโดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 291.67 เป็น 163.89 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ส่วนอัตราการหายใจ state 3u หลังเติม DNP ของกลุ่มที่เติม gemfibrozil ก็ถูกยับยั้งโดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 397.22 เป็น 283.33 นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ส่วน tracings C และ D แสดงการหายใจของไมโตคอนเดรียที่เติม clofibric acid ขนาด 100 µM และ 400 µM ตามลำดับ จะเห็นว่าการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ได้มีรูปแบบการตอบสนองเหมือนกับไมโตคอนเดรียกลุ่มที่เติม gemfibrozil(tracing B) คือ หลังเติม clofibric acid จะมีอัตราการหายใจใน state 4 เพิ่มขึ้นขณะที่อัตราการหายใจใน state 3 และ 3u ลดลง ความแรงของการตอบสนองขึ้นกับขนาดของ clofibric acid ที่เติมลงไป คือที่ขนาด 400 µM ตอบสนองมากกว่าที่ขนาด 100 µM

ในตารางที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบผลของ gemfibrozil กับ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจ state 4 โดยใช้ยาขนาดต่าง ๆ คือ gemfibrozil ในขนาด 60 μM และ 100 μM ส่วน clofibric acid ใช้ขนาด 100 μM, 200 μM และ 400 μM จากผลในตารางจะเห็นว่าทั้ง gemfibrozil และ clofibric acid ทุกขนาดความเข้มข้นที่ใช้กระตุ้นการหายใจใน state 4 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์ของการกระตุ้นหายใจใน state 4 พบว่าที่ขนาดยาเท่ากัน คือที่ขนาด 100 μM gemfibrozil ให้ผลในการกระตุ้น state 4 respiration มากกว่า clofibric acid โดย clofibric acid ขนาด 100 μM กระตุ้นการหายใจ state 4 ได้เพียง 5.67 $\pm$ 3.35 % ในขณะที่ gemfibrozil ในขนาด 100 μM สามารถกระตุ้นการหายใจใน state 4 ได้ถึง 76.45$\pm$4.29%

ในตารางที่ 19 แสดงผลของ gemfibrozil เปรียบเทียบกับ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจ state 3 โดยใช้ gemfibrozil และ clofibric acid ในความเข้มข้นเดียวกับในตารางที่ 18 จากผลจะเห็นว่าทั้ง gemfibrozil และ clofibric acid ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ให้ผลยับยั้งการหายใจ state 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เติม alcohol 10 มคล. และเมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การยับยั้งการหายใจใน state 3 พบว่าเมื่อใช้ gemfibrozil และ clofibric acid ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 100 μM พบว่า gemfibrozil ให้ผลยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3 มากกว่า clofibric acid โดยกลุ่มที่เติม gemfibrozil จะเกิดการยับยั้ง state 3 คิดเป็น 44.50 $\pm$ 2.69% ขณะที่ clofibric acid ยับยั้ง state 3 ได้เพียง 4.73 $\pm$ 2.08 %

ในตารางที่ 20 แสดงผลของ gemfibrozil เปรียบเทียบกับ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจใน state 3u โดยใช้

gemfibrozil และ clofibric acid ในความเข้มข้นเดียวกับในตารางที่ 18 และ 19 จากผลที่ได้จะเห็นว่าทั้ง gemfibrozil และ clofibric acid ทุกความเข้มข้นที่ใช้ให้ผลยับยั้ง state 3u อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การยับยั้งการหายใจใน state 3u ของ gemfibrozil และ clofibric acid ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 100 µM พบว่า gemfibrozil ให้ผลยับยั้งการหายใจ state 3u มากกว่า clofibric acid โดย gemfibrozil ยับยั้งการหายใจ state 3u คิดเป็น 34.62 ± 1.73 % ส่วน clofibric acid ขนาด 100 µM ให้ผลยับยั้ง state 3u คิดเป็น 8.01 ± 1.54 % เท่านั้น

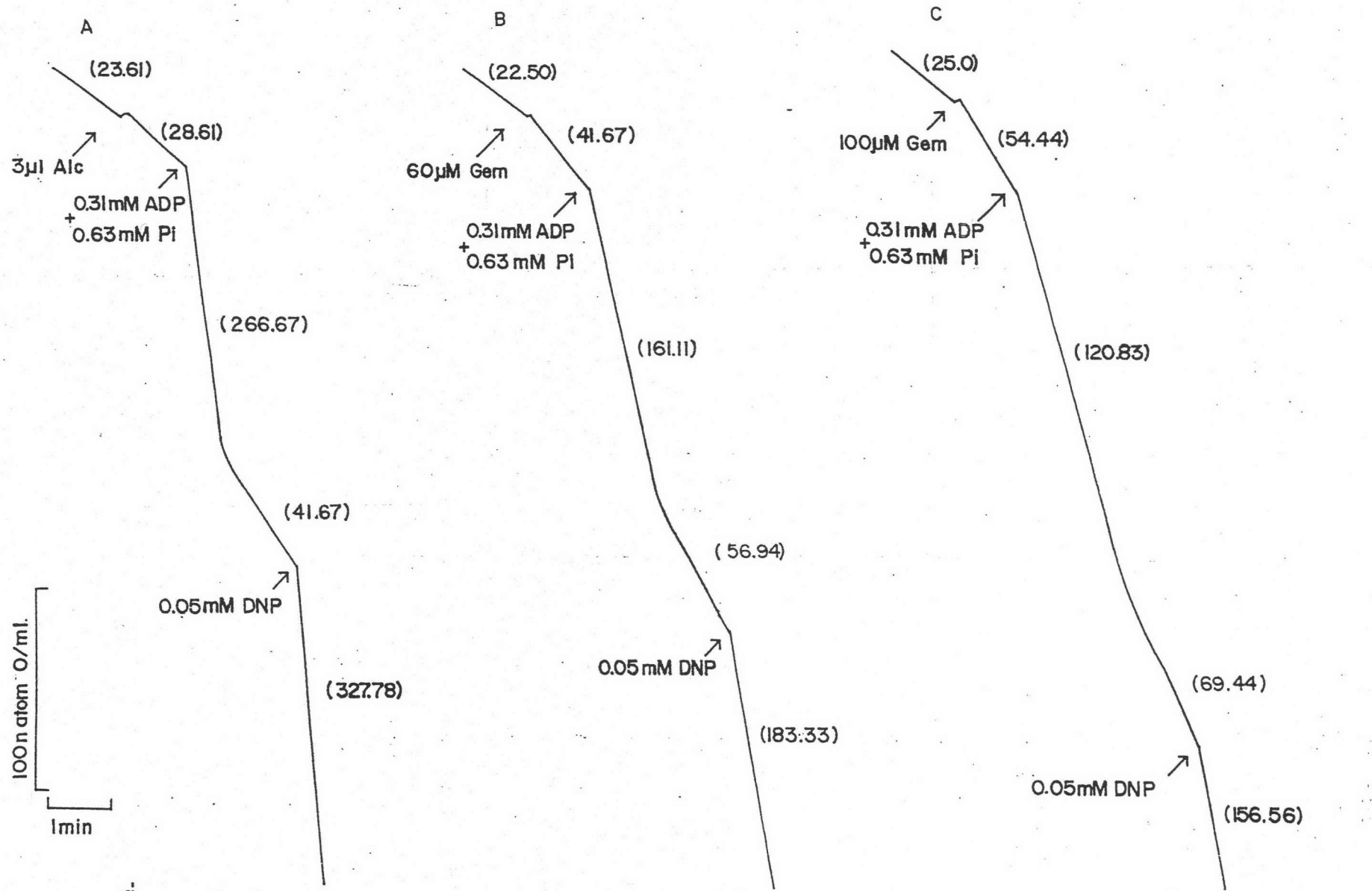
ผลวิจัยดังกล่าวข้างต้นนี้ชี้ให้เห็นว่าทั้ง clofibric acid และ gemfibrozil สามารถยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate ได้ แต่เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 100 µM จะพบว่า gemfibrozil ให้ผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้มากกว่า clofibric acid จึงอาจกล่าวได้ว่าต้องใช้ clofibric acid ในความเข้มข้นสูงกว่า gemfibrozil จึงจะให้ผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ใกล้เคียงกัน

รูปและตารางประกอบผลการวิจัย

รูปที่ 16 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ในความเข้มข้น 60 µM และ 100 µM ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.52 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 89.11 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.03 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรีย 2.33 มก.โปรตีน/มล. กลุ่มควบคุมใช้ absolute ethanol 5 มคล. และกลุ่มตัวอย่างใช้ gemfibrozil ในความเข้มข้น 60 µM และ 100 µM incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาทีก่อนเติม ADP + Pi ปริมาตรทั้งหมด 1.919 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บและมีหน่วยเป็นจำนวน นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที

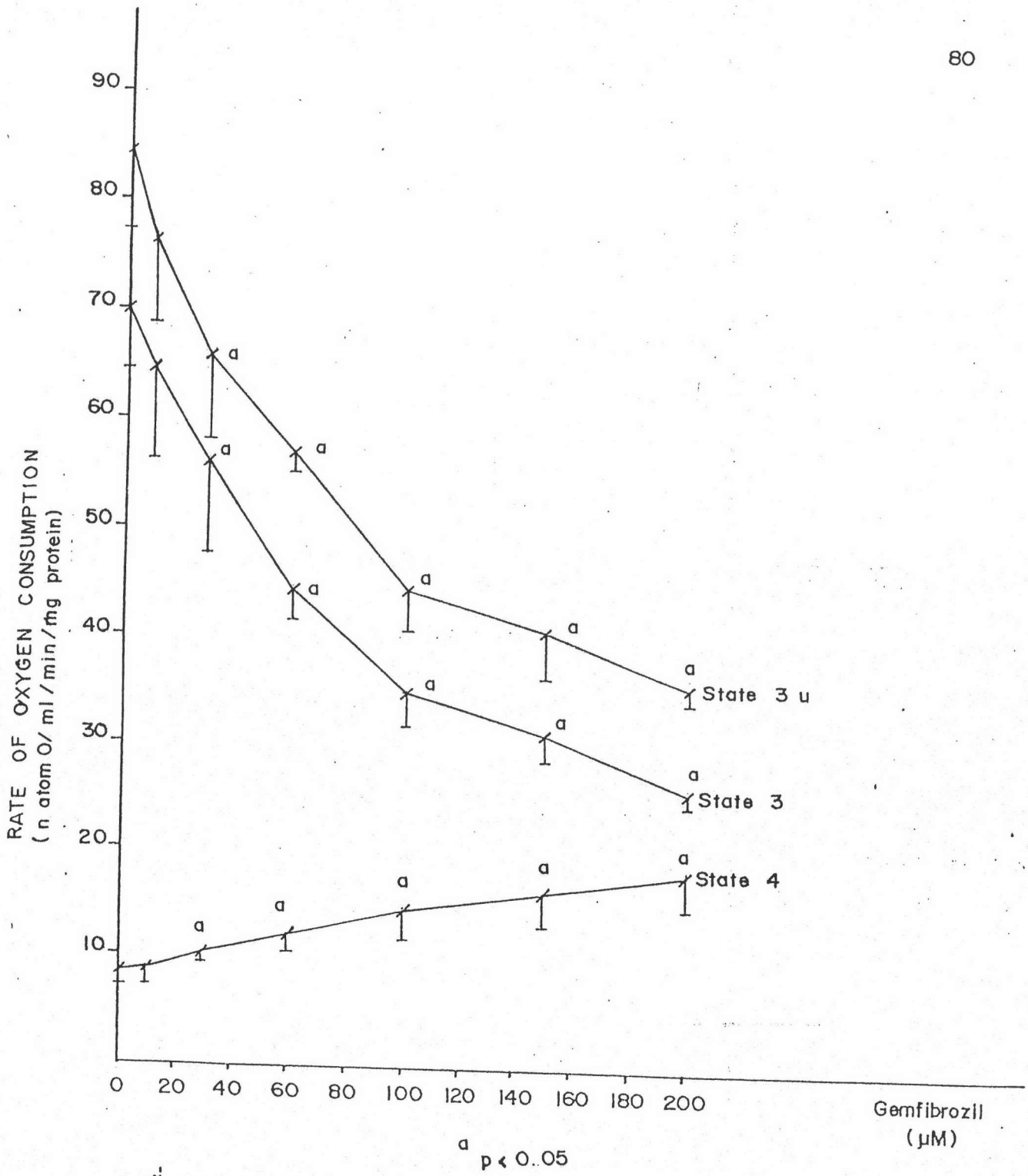


รูปที่ 16 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ในความเข้มข้น 60 µM และ 100 µM ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate -

รูปที่ 17 Dose-response curve ของ gemfibrozil ที่มีต่อ states 4, 3 และ 3u respiration ของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.52 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 89.11 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.03 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.91 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ gemfibrozil ที่ใช้เติมได้แก่ 10 µM, 30 µM, 60 µM, 100 µM, 150 µM และ 200 µM ปริมาตรทั้งหมด 1.919 มล. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง

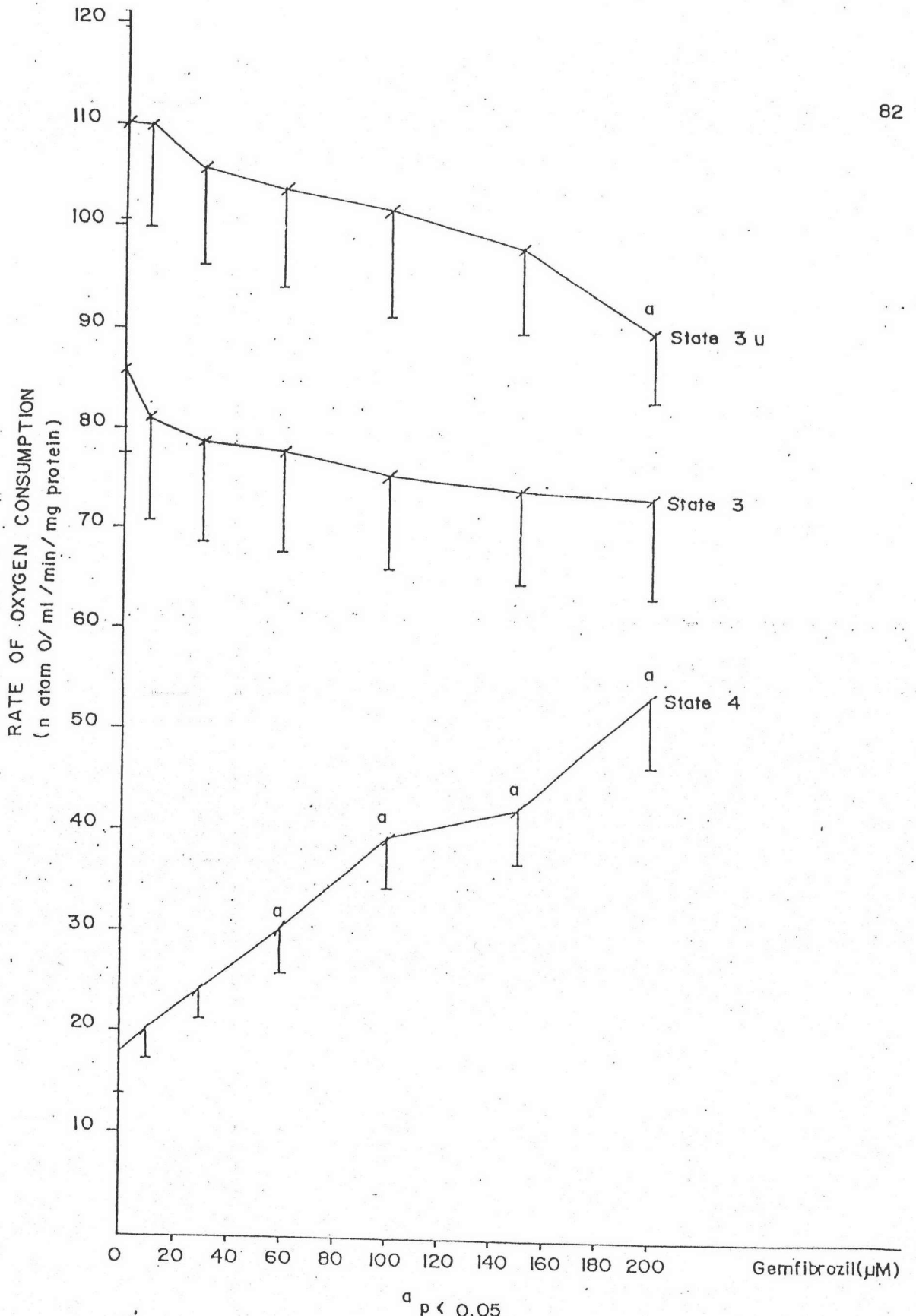


รูปที่ 17 Dose-response curve ของ gemfibrozil ที่มีต่อ states 4, 3 และ 3u respiration ของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

รูปที่ 18 Dose-response curve ของ gemfibrozil ที่มีต่อ states 4, 3 และ 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.52 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 89.11 mM KCl, 5.21 mM potassium sucinate, 13.03 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.91 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ gemfibrozil ที่ใช้เติมคือ 10 µM, 30 µM, 60 µM, 100 µM, 150 µM และ 200 µM ปริมาตรทั้งหมด 1.919 มล. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง



รูปที่ 18 Dose-response curve ของ gemfibrozil ที่มีต่อ states 4, 3 และ 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

ตารางที่ 6 ผลของ gemfibrozil ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate+malate และ succinate เป็น substrates

Experiments	glutamate + malate		succinate	
	RCI	ADP/O	RCI	ADP/O
control(5 µl ethanol)	6.89±2.02	2.71±0.03	4.08±0.62	1.41±0.22
10 µM gemfibrozil	6.08±1.52*	2.57±0.08	3.96±0.52	1.91±0.03
60 µM gemfibrozil	3.07±0.51*	2.44±0.13*	2.50±0.35*	1.00±0.07*
100 µM gemfibrozil	2.19±0.28*	2.00±0.12*	1.71±0.33*	1.76±0.11*

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.52 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 89.11 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate หรือ 5.21 mM potassium succinate, 13.03 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.91 มก.โปรตีน/มล. เติม absolute ethanol หรือ gemfibrozil ในขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรียเป็นเวลานาน 1 นาที จากนั้นเติม ADP + Pi ปริมาตรทั้งหมด 1.919 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 7 ผลของ gemfibrozil ต่อ state 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate, succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrates

substrates	rate of state 3u respiration (natom O/ml/min/mg protein)	
	control	60 μM gemfibrozil
glutamate + malate	106.06 ± 11.67	64.45 ± 20.85*
succinate	110.03 ± 18.99	103.56 ± 19.28
ascorbate + TMPD	140.73 ± 19.36	141.85 ± 18.86

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.60 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.48 mM KCl, 5.22 mM potassium glutamate + 5.22 mM potassium malate หรือ 5.22 mM potassium succinate หรือ 2.09 mM ascorbate + 0.52 mM TMPD, 0.05 mM DNP, 13.04 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.72 มก.โปรตีน/มล. เติม DNP ลงไปใน chamber ก่อนจึงเติม gemfibrozil แล้ว incubate นาน 1 นาที จึงใส่ substrate ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 8 ผลของ gemfibrozil ต่อ state 3u respiration ของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH, succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrates

substrates	rate of state 3u respiration (natom O/ml/min/mg protein)	
	control	60μM gemfibrozil
NADH	11.21 ± 0.78	7.00 ± 0.29*
succinate	23.67 ± 4.80	23.58 ± 4.75
ascorbate + TMPD	43.90 ± 6.51	42.83 ± 5.14

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

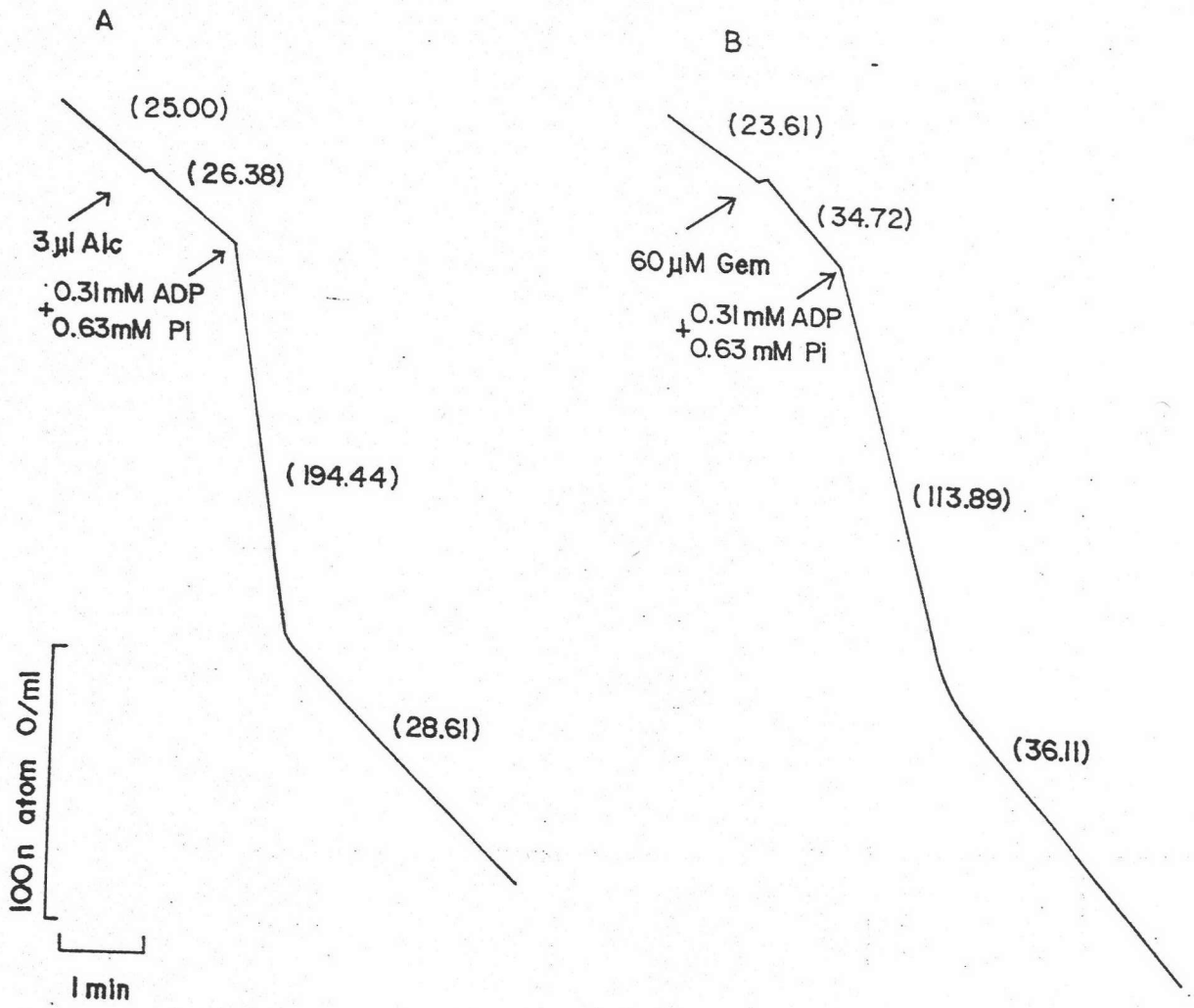
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.64 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 27.76 mM KCl, 1.05 mM NADH หรือ 5.23 mM potassium glutamate หรือ 5.23 mM potassium succinate หรือ 2.09 mM ascorbate + 0.52 mM TMPD, 0.05 mM DNP, 1.31 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.72 มก.โปรตีน/มล. เติม gemfibrozil ลงไป incubate นาน 1 นาที ก่อนเติม substrate ปริมาตรทั้งหมด 1.913 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 19 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 µM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.60 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.48 mM KCl, 5.22 mM potassium glutamate + 5.22 mM potassium malate, 13.04 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi และไมโตคอนเดรีย 2.00 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่ที่เติมคือ absolute ethanol และ gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่าง ๆ แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

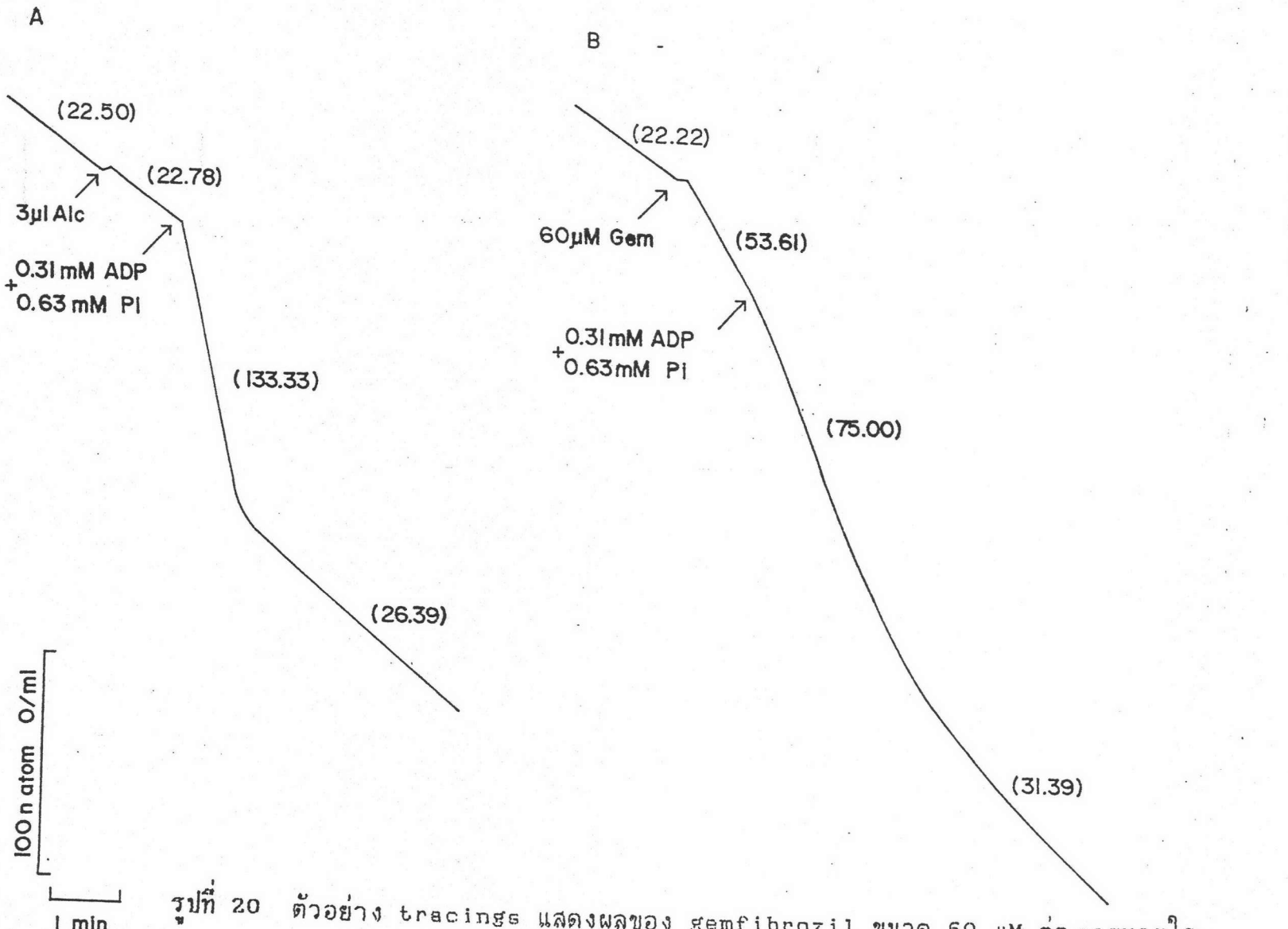


รูปที่ 19 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 µM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

รูปที่ 20 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 µM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ β-hydroxybutyrate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.60 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.48 mM KCl, 5.22 mM potassium β-hydroxybutyrate, 13,04 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi และไมโตคอนเดรีย 2.00 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol และ gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่าง ๆ แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณเป็น จำนวน นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที

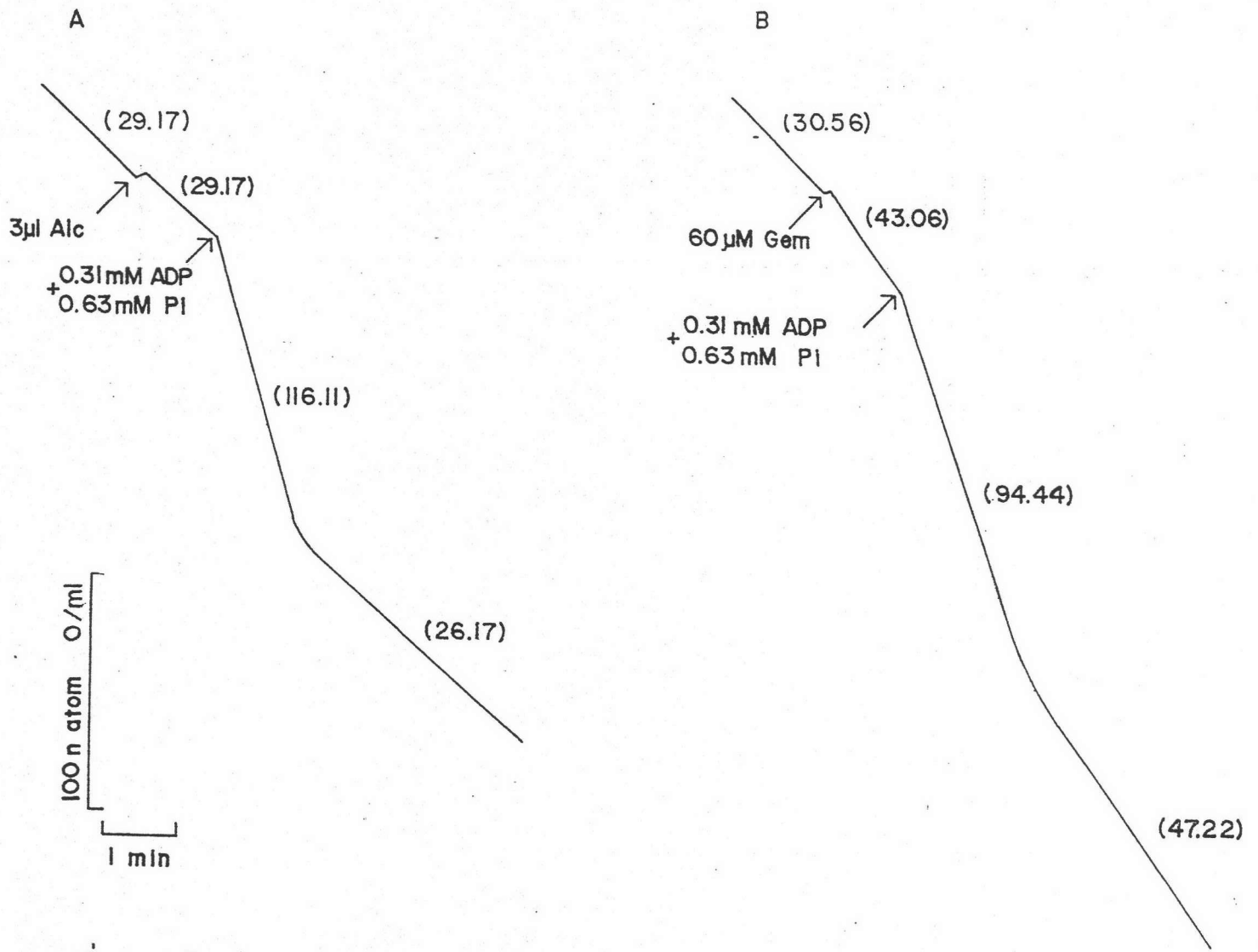


รูปที่ 20 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 µM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ β-hydroxybutyrate เป็นsubstrate

รูปที่ 21 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 µM ต่อการหายใจไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ α-ketoglutarate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.60 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.48 mM KCl, 5.22 mM potassium α-ketoglutarate, 13.04 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi และไมโตคอนเดรีย 2.00 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่น ๆ ที่เติมคือ absolute ethanol และ gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่าง ๆ แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณเป็น จำนวน นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที



รูปที่ 21 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ขนาด 60 µM ต่อการหายใจไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ α-ketoglutarate เป็น substrate

ตารางที่ 9 ผลของ gemfibrozil ขนาด 60 μM ต่อ state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD^+-linked substrates

substrates	rate of state 3 respiration (natom O/ml/min/mg protein)	
	control	60μM gemfibrozil
glutamate + malate	54.28 ± 2.70	34.31 ± 1.75*
β-hydroxybutyrate	36.84 ± 4.70	21.19 ± 4.30*
α-ketoglutarate	30.54 ± 2.05	26.40 ± 0.88*

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.64 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.57 mM KCl, 5.31 mM potassium glutamate + 5.31 mM potassium malate หรือ 5.31 mM potassium β-hydroxybutyrate หรือ 5.31 mM potassium α-ketoglutarate, 13.05 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.97 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol และ gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียคำนวณเป็นจำนวน นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน

ตารางที่ 10 ผลของ gemfibrozil ขนาด 60 μM ต่อ state 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD^+-linked substrates

substrates	rate of state 3u respiration (natom O/ml/min/mg protein)	
	control	60μM gemfibrozil
glutamate + malate	44.82 ± 1.01	15.56 ± 1.26*
β-hydroxybutyrate	25.63 ± 1.37	22.08 ± 0.86*
α-ketoglutarate	4.93 ± 0.24	4.10 ± 0.06*

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.60 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.48 mM KCl, 5.22 mM potassium glutamate + 5.22 mM potassium malate หรือ 5.22 mM potassium β-hydroxybutyrate หรือ 5.22 mM potassium α-ketoglutarate, 13.04 mM sucrose, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.97 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol และ gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียคำนวณเป็นจำนวน นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน

ตารางที่ 11 ผลของ gemfibrozil ขนาด 60 μM ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD^+-linked substrates

substrates	RCI	
	control	60μM gemfibrozil
glutamate + malate	6.09 ± 0.85	3.08 ± 0.18*
β-hydroxybutyrate	4.89 ± 0.26	1.90 ± 0.15*
α-ketoglutarate	4.00 ± 0.34	2.05 ± 0.16*

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.64 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.57 mM KCl, 5.31 mM potassium glutamate + 5.31 mM potassium malate หรือ 5.31 mM potassium β-hydroxybutyrate หรือ 5.31 mM potassium α-ketoglutarate, 13.05 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.97 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมลงไปคือ absolute ethanol และ gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.913 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 12 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการกระตุ้น state 4 respiration ของไมโตคอนเดรีย

pH	rate of state 4 respiration (natom O/ml/min/mg protein)		% stimulation of state 4 respiration
	control	60 μM gemfibrozil	
6.8	9.59 ± 1.44	13.52 ± 1.57*	42.68 ± 6.23
7.2	10.31 ± 0.68	13.99 ± 1.55*	35.42 ± 8.36
7.6	11.37 ± 1.54	14.15 ± 0.93*	25.34 ± 9.77

* $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.60 mM HEPES buffer pH 6.8, 7.2 และ 7.6, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.48 mM KCl, 5.22 mM potassium glutamate + 5.22 mM potassium malate, 13.04 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.23 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol และ gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย คำนวณเป็น นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน และเปอร์เซนต์การกระตุ้น state 4 respiration แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 13 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการยับยั้ง state 3 respitation ของไมโตคอนเดรีย

pH	rate of state 3 respiration (natom O/ml/min/mg protein)		% inhibition of state 3 respiration
	control	60 μM gemfibrozil	
6.8	60.13 ± 2.31	36.93 ± 1.99*	38.56 ± 3.07
7.2	59.00 ± 4.41	48.44 ± 3.18*	17.82 ± 2.83
7.6	52.93 ± 2.16	44.52 ± 1.37*	15.87 ± 1.73

* $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.60 mM HEPES buffer pH 6.8, 7.2 และ 7.6, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.48 mM KCl, 5.22 mM potassium glutamate + 5.22 mM potassium malate, 13.04 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.23 มก.โปรตีน/มล. กลุ่มควบคุมเติม absulute ethanol ส่วนกลุ่มตัวอย่างเติม gemfibrozil incubate นาน 1 นาที ก่อนเติม ADP + Pi ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย คำนวณเป็น นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน และเปอร์เซนต์การยับยั้ง state 3 respiration แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 14 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการยับยั้ง state 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย

pH	rate of state 3u respiration (natom O/ml/min/mg protein)		% inhibition of state 3u respiration
	control	60 μM gemfibrozil	
6.8	83.76 ± 5.91	49.50 ± 5.59*	40.99 ± 2.76
7.2	86.71 ± 3.61	69.68 ± 7.03*	19.74 ± 5.76
7.6	75.86 ± 1.65	68.84 ± 4.13*	9.46 ± 4.26

* $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

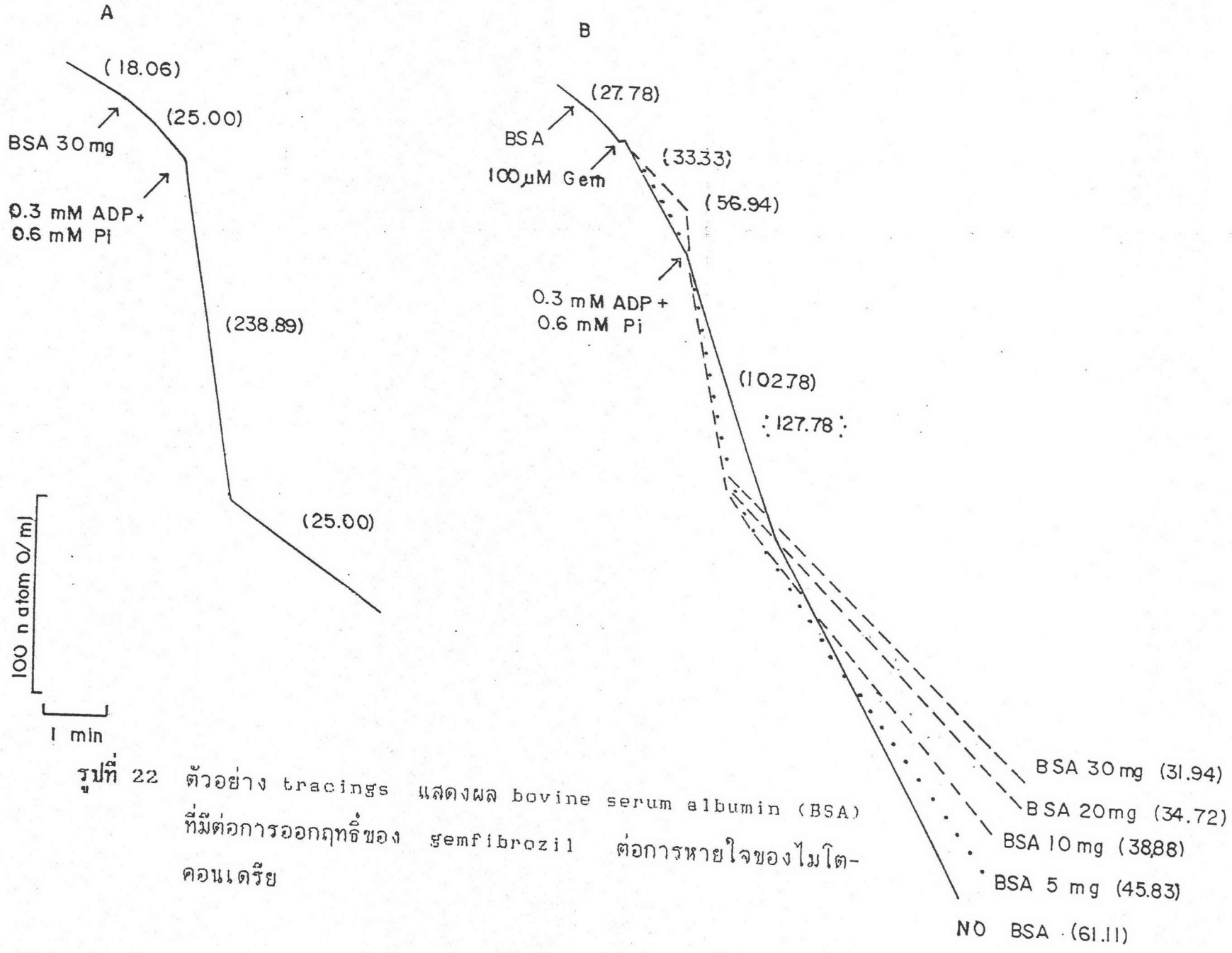
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.56 mM HEPES buffer pH 6.8, 7.2 และ 7.6, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.38 mM KCl, 5.22 mM potassium glutamate + 5.22 mM potassium malate, 13.04 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.23 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol หรือ gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.915 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย คำนวณเป็น นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน และเปอร์เซนต์การยับยั้ง state 3u respiration แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 22 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.26 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM $MgCl_2$, 81.10 mM KCl, 5.04 mM potassium glutamate + 5.04 mM potassium malate, 12.60 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi และไมโตคอนเดรีย 1.92 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมลงไปดังรูปคือ BSA ขนาด 5, 10, 20 และ 30 มก., gemfibrozil ขนาด 100 µM ปริมาตรทั้งหมด 1.985 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียภาวะต่าง ๆ แสดงไว้ในวงเล็บและคำนวณเป็น จำนวน นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที

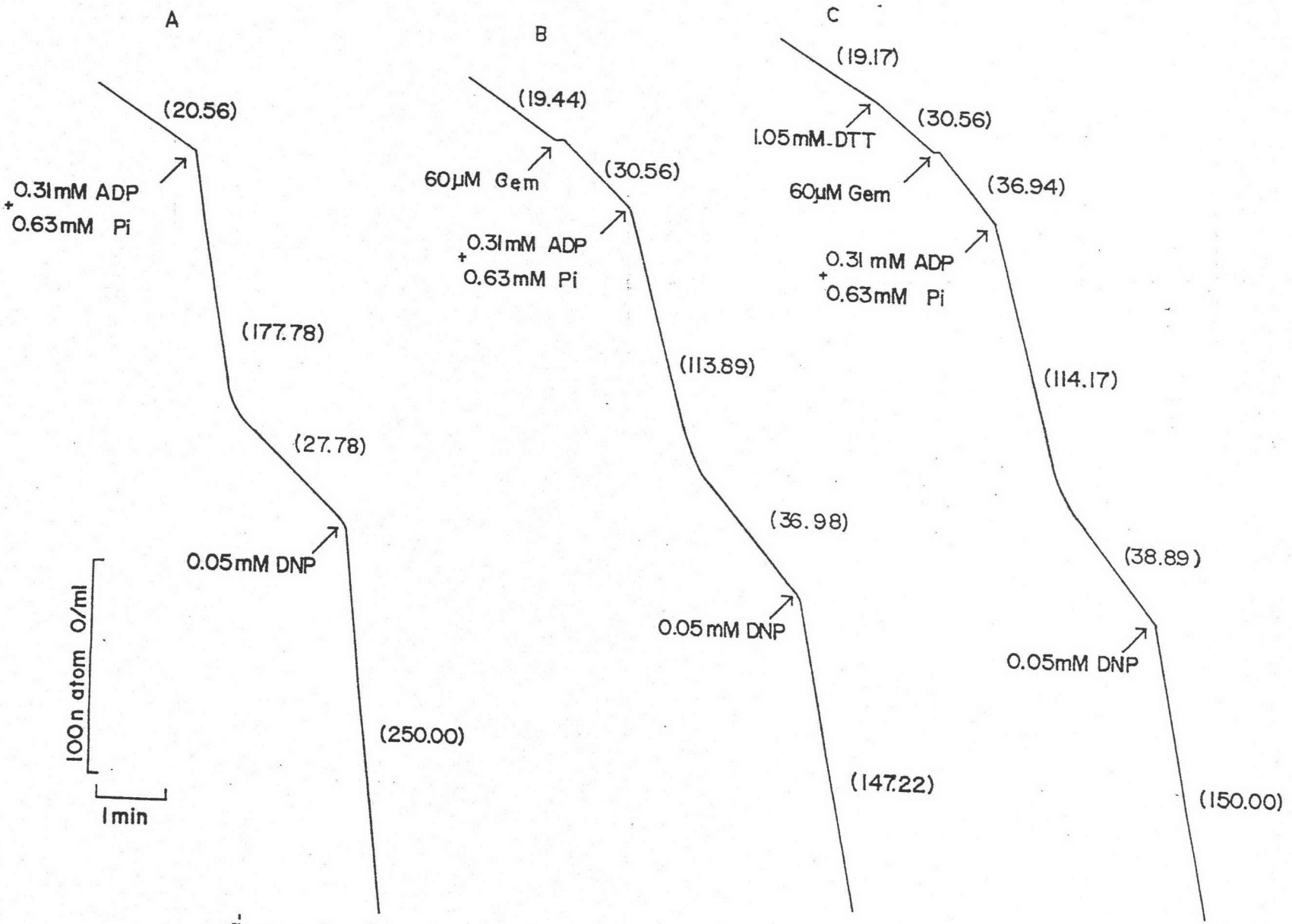


รูปที่ 22 ตัวอย่าง tracings แสดงผล bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 23 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ dithiothreitol(DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.52 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.29 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.03 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP, ไมโตคอนเดรีย 1.86 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมได้แก่ 1.05 mM DTT และ 60 µM gemfibrozil ปริมาตรทั้งหมด 1.919 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ และมีหน่วยเป็น จำนวน นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที



รูปที่ 23 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ dithiothreitol(DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ตารางที่ 15 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ gemfibrozil ในการกระตุ้นการหายใจ state 4, การยับยั้ง state 3 และ 3u ของไมโตคอนเดรีย

Experiments	rate of oxygen consumption (natom O/ml/min/mg protein)		
	state 4	state 3	state 3u
control	6.32±0.16	48.56±1.30	63.10±3.59
60 μM gemfibrozil	8.23±0.33	29.75±2.31	41.73±1.31
1.05 mM DDT + 60 μM gemfibrozil	9.14±0.18*	30.44±2.84	40.87±1.59

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ 60 μM gemfibrozil

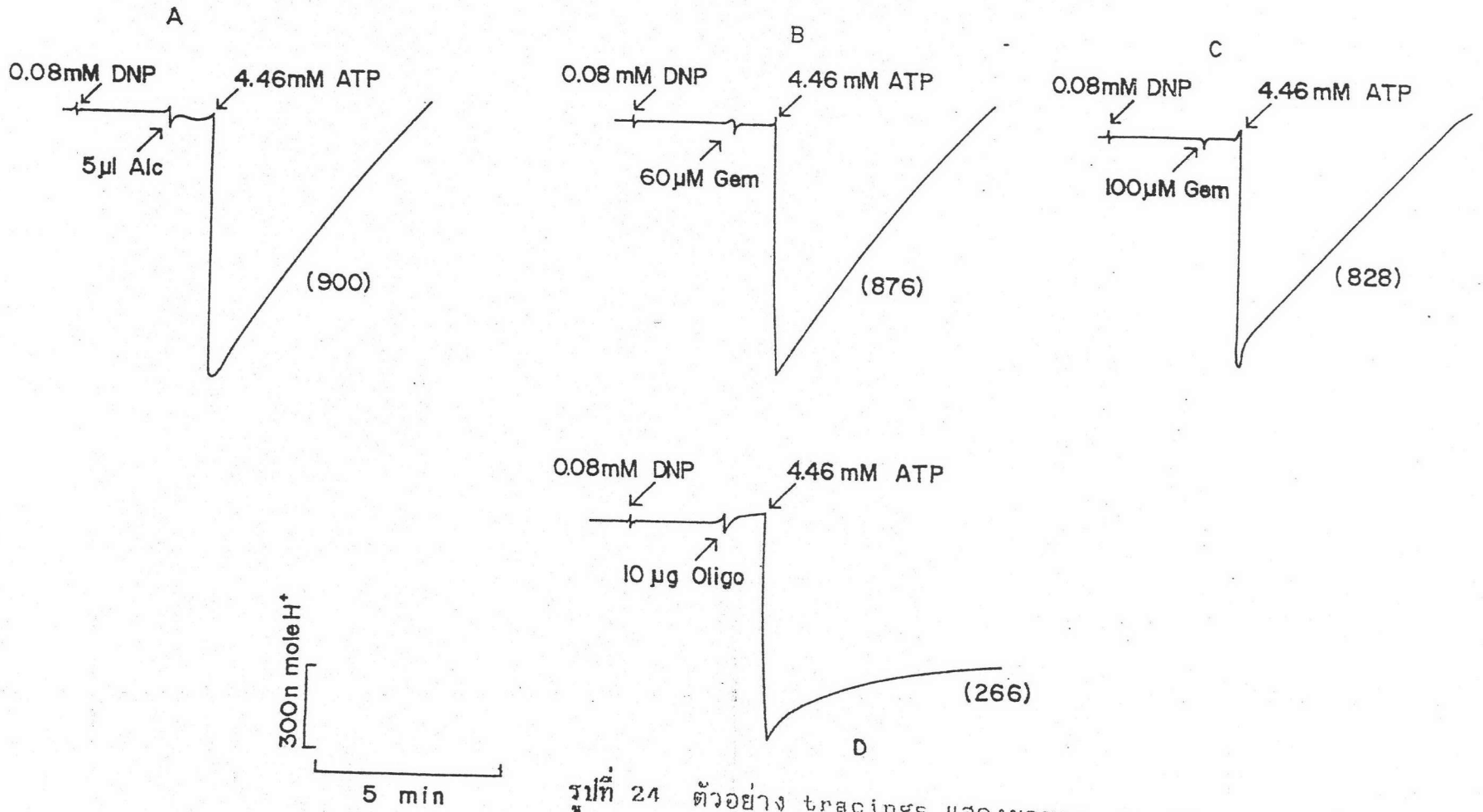
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.52 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.29 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.03 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP, ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.88 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมลงไปคือ 1.05 mM DTT และ 60 μM gemfibrozil ซึ่งจะต้อง incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 5 นาทีก่อนเติม glutamate + malate, ADP + Pi และ DNP ปริมาตรทั้งหมด 1.919 มล. อุณภูหมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่าง ๆ แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง และมีหน่วยเป็น จำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน

รูปที่ 24 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรียเมื่อถูกกระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 4.46 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.79 mM $MgCl_2$, 105.36 mM KCl และไมโตคอนเดรีย 2.12 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปดังแสดงในรูปคือ DNP, absolute ethanol หรือ gemfibrozil หรือ oligomycin และ ATP ปริมาตรทั้งหมด 3.36 มล. ที่อุณหภูมิห้อง

activity ของเอนไซม์ ATPase แสดงในวงเล็บคำนวณเป็นจำนวนนม.โปรตอน/5 นาที



รูปที่ 24 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรียเมื่อถูกกระตุ้นด้วย DNP

ตารางที่ 16 ผลของ gemfibrozil ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

Experiments	ATPase activity (n mole H^+/mg protein/5 min)	
	DNP	no DNP
none	131.02 ± 0.58	0
alcohol 5 µl	132.86 ± 1.83[a]	0
60 µM gemfibrozil	115.96 ± 8.18[b,c]	16.36 ± 0.90
100 µM gemfibrozil	105.68 ± 8.63[b,c]	21.88 ± 1.08
oligomycin 10 µg	30.20 ± 5.15[b]	-

[a] $p > 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ none

[b] $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ alcohol 5 µl

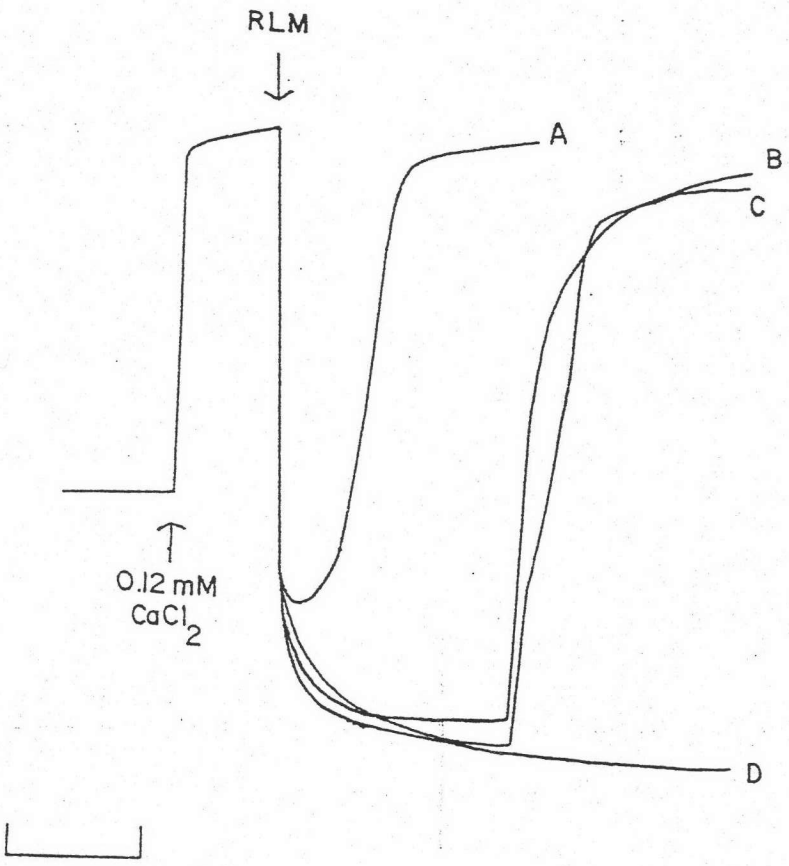
[c] $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ oligomycin 10 µg

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 4.46 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.79 mM $MgCl_2$, 105.36 mM KCl และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.47 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปในกรณีที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP คือ DNP, absolute ethanol หรือ gemfibrozil หรือ oligomycin และ ATP ส่วนในกรณีที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP นั้นจะเติม gemfibrozil และ ATP ปริมาตรทั้งหมด 3.36 และ 3.355 มล. ในกรณีที่มี DNP และไม่มี DNP ตามลำดับ ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง

activity ของเอนไซม์ ATPase แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง และมีหน่วยเป็นจำนวน นนม. โปรตอน/มก.โปรตีน/5 นาที

รูปที่ 25 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.33 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.87 mM $MgCl_2$, 85.85 mM KCl, 0.93 mM potassium phosphate, 3.11 mM potassium glutamate + 3.11 mM potassium malate, 15.55 mM sucrose, 0.12 mM $CaCl_2$ และไมโตคอนเดรีย (RLM) 2.19 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมลงไปดังภาพคือ 60 µM gemfibrozil หรือ DNP ปริมาตรทั้งหมด 3.215 มล. ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง



A - 60 μM gemfibrozil added initially.

B - 0.05 mM DNP added 5 min. after RLM

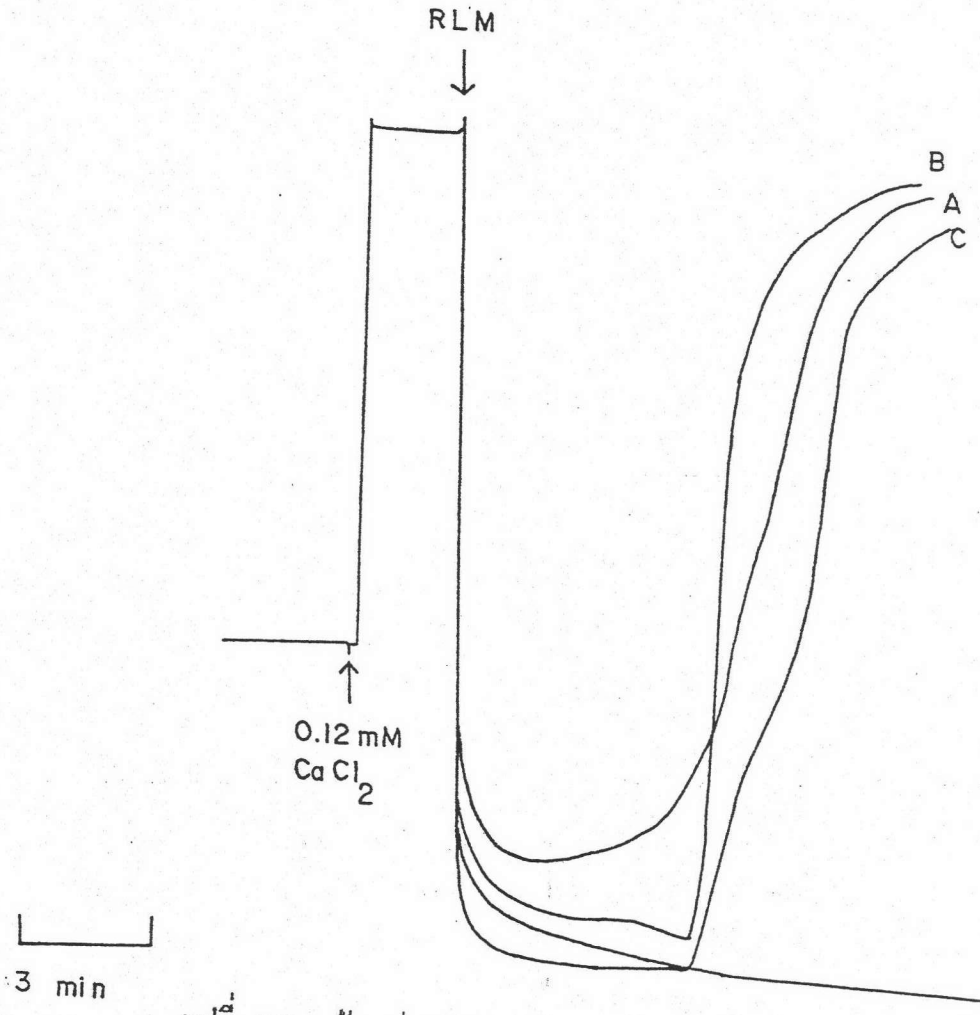
C - 60 μM gemfibrozil added 5 min after RLM

D - Control

รูปที่ 25 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

รูปที่ 26 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น subtrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.33 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.87 mM $MgCl_2$, 85.85 mM KCl, 0.93 mM potassium phosphate, 3.11 mM potassium succinate, 15.55 mM sucrose, 0.12 mM $CaCl_2$ และไมโตคอนเดรีย (RLM) 2.43 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมลงไปดังภาพคือ 60 μM gemfibrozil หรือ DNP ปริมาตรทั้งหมด 3.215 มล. ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง



A - 60μM gemfibrozil added initially

B - 0.05 mM DNP added 5 min after RLM

C - 60μM gemfibrozil added 5 min after RLM

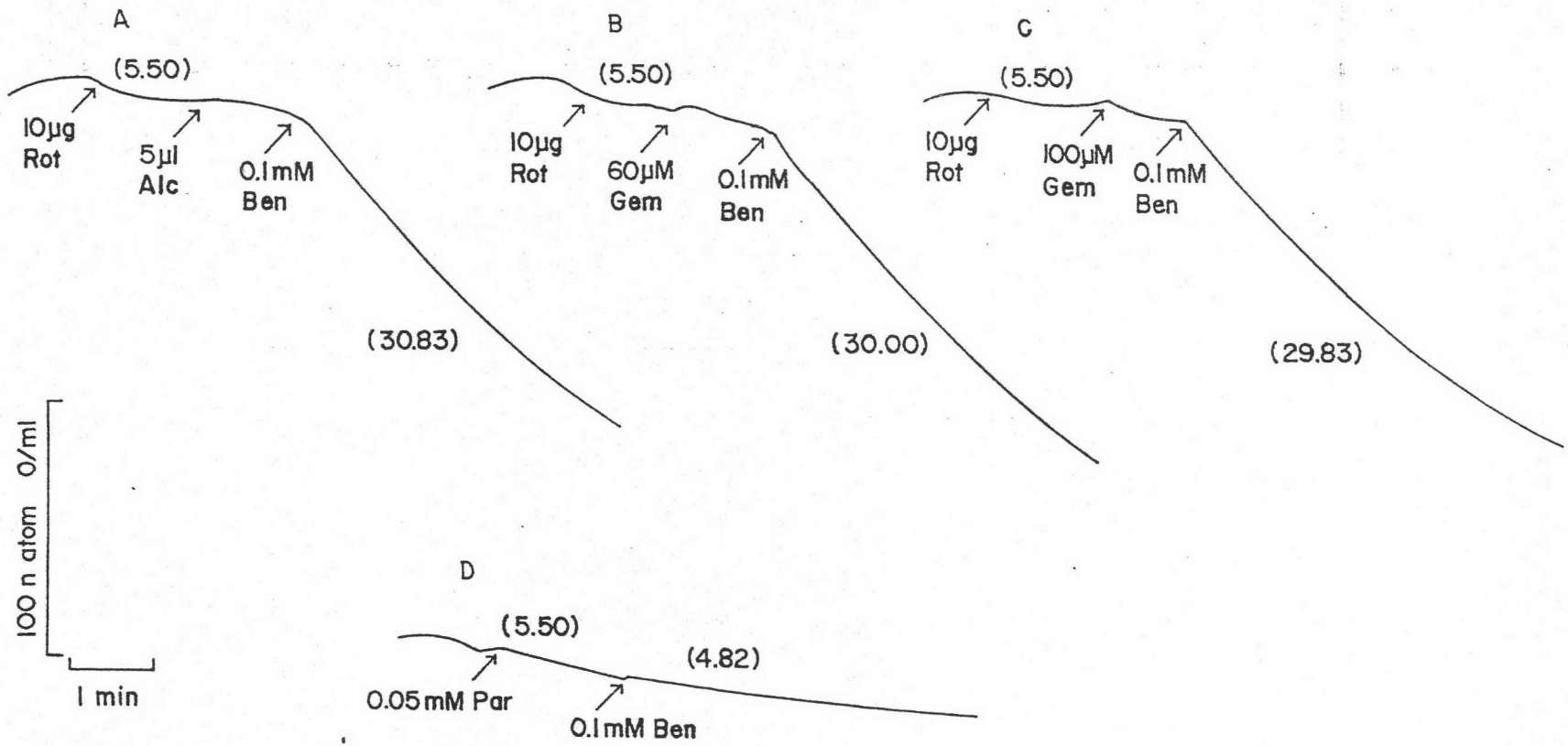
D - Control

รูปที่ 26 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น subtrate

รูปที่ 27 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ต่อ activity ของเอนไซม์ monomine oxidase (MAO) ของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.023 M KH_2PO_4 pH 7.2, 13.04 mM sucrose, 10 µg rotenone (Rot) และไมโตคอนเดรีย 2.52 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมดังรูปคือ absolute ethanol หรือ gemfibrozil หรือ pargyline (Par) และ benzylamine (Ben) ปริมาตรทั้งหมด 1.917 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่าง ๆ แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็น จำนวน นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที



รูปที่ 27 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil ต่อ activity ของเอนไซม์ monomine oxidase (MAO) ของไมโตคอนเดรีย

ตารางที่ 17 ผลของ gemfibrozil ต่อ activity ของเอนไซม์ MAO ของไมโตคอนเดรีย

Experiments	rate of oxygen consumption หลังเติม benzylamine 0.1 mM (natom O/ml/min/mg protein)
control	6.382 ± 0.725
60 µM gemfibrozil	6.212 ± 0.562[a]
100 µM gemfibrozil	6.175 ± 0.661[a]
0.05 mM pargyline	0.997 ± 0.090[b]

[a] $p > 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

[b] $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

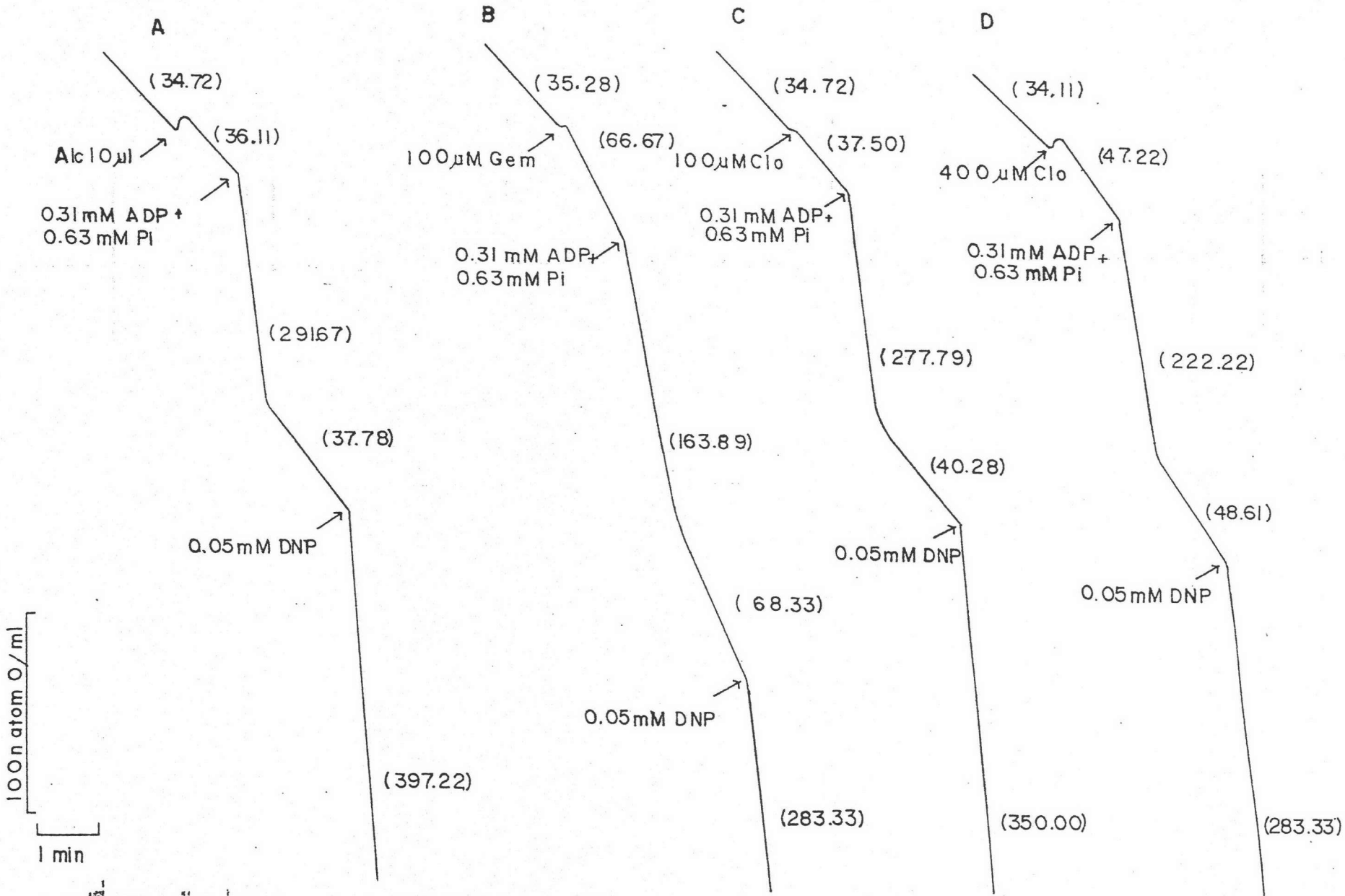
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.023 mM KH_2PO_4 pH 7.2, 13.04 mM sucrose, 10 µg rotenone และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.93 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol หรือ gemfibrozil หรือ pargyline และ benzylamine ปริมาตรทั้งหมด 1.917 มล. ที่อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลองและมีหน่วยเป็น จำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที/มก. โปรตีน

รูปที่ 28 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil และ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.42 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.87 mM $MgCl_2$, 86.07 mM KCl, 13.02 mM sucrose, 5.20 mM potassium glutamate + 5.20 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรีย 1.86 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมดังรูปคือ absolute ethanol 10 µl หรือ gemfibrozil หรือ clofibric acid ปริมาตรทั้งหมด 1.924 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บและมีหน่วยเป็น จำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที



รูปที่ 28 ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ gemfibrozil และ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบผลของ gemfibrozil กับ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

Experiments	rate of state 4 respiration (natom o/ml/min/ mg protein)	% stimulation of state 4 respiration
control(alcohol 10µl)	8.52 ± 0.18	0
60 µM gemfibrozil	11.44 ± 0.50*	34.23 ± 4.62
100 µM gemfibrozil	15.52 ± 0.58*	76.45 ± 4.29
100 µM clofibric acid	9.00 ± 0.25*	5.67 ± 3.35
200 µM clofibric acid	10.01 ± 0.38*	17.55 ± 4.96
400 µM clofibric acid	11.41 ± 0.15*	33.92 ± 3.66

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.87 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 13.02 mM sucrose, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.02 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol 10 มคล. หรือ gemfibrozil ขนาด 60 µM และ 100 µM หรือ clofibric acid ขนาด 100 µM, 200 µM และ 400 µM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง และมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที/มก. โปรตีน

เปอร์เซนต์ของการกระตุ้นการหายใจ state 4 แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบผลของ gemfibrozil กับ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจ state 3 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

Experiments	rate of state 3 respiration (natom o/ml/min/ mg protein)	% inhibition of state 3 respiration
control(alcohol 10µl)	69.33 ± 1.89	0
60 µM gemfibrozil	45.18 ± 1.75*	34.84 ± 1.42
100 µM gemfibrozil	38.51 ± 2.72*	44.50 ± 2.69
100 µM clofibric acid	66.07 ± 2.87*	4.73 ± 2.08
200 µM clofibric acid	60.02 ± 1.69*	13.42 ± 1.45
400 µM clofibric acid	53.48 ± 0.86*	22.84 ± 1.60

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.46 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.87 mM $MgCl_2$, 86.16 mM KCl, 13.02 mM sucrose, 5.20 mM potassium glutamate + 5.20 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.02 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol หรือ gemfibrozil หรือ clofibric acid ปริมาตรทั้งหมด 1.922 มล. ที่อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง และมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที/มก. โปรตีน

เปอร์เซนต์ของการยับยั้งการหายใจ state 3 แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 20 การเปรียบเทียบผลของ gemfibrozil กับ clofibric acid ที่มีต่อการหายใจ state 3u ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

Experiments	rate of state 3u respiration (natom o/ml/min/ mg protein)	% inhibition of state 3u respiration
control(alcohol 10µl)	92.84 ± 0.03	0
60 µM gemfibrozil	66.70 ± 3.13*	28.18 ± 1.15
100 µM gemfibrozil	60.72 ± 2.74*	34.62 ± 1.13
100 µM clofibric acid	85.37 ± 1.59*	8.01 ± 1.54
200 µM clofibric acid	78.75 ± 1.11*	15.14 ± 1.69
400 µM clofibric acid	70.29 ± 1.02*	24.25 ± 1.55

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.42 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.87 mM $MgCl_2$, 86.07 mM KCl, 13.02 mM sucrose, 5.20 mM potassium glutamate + 5.20 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.63 mM Pi, 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.02 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมคือ absolute ethanol หรือ gemfibrozil หรือ clofibric acid ปริมาตรทั้งหมด 1.924 มล. ที่อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนในการหายใจ state 3u ของไมโตคอนเดรีย แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง และมีหน่วยเป็น นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที/มก.โปรตีน

เปอร์เซนต์ของการยับยั้งการหายใจ state 3u แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง