

บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนที่สกัดจากแขนคอคำใหญ่ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนูขาว

1. ผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย

รูปที่ 16 เป็น oxygraph tracings ซึ่งได้จากการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ โดย polarographic oxygen electrode technique ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ตัวเลขที่กำกับอยู่ที่ระยะต่าง ๆ ของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะ (state) ต่าง ๆ โดยคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน /มล. /นาที

tracing 16A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ในระยะแรกของ tracing 16A ส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยามีเพียงไมโทคอนเดรียใน incubation medium ที่มี glutamate+malate เป็นสับสเตรทอยู่ในปริมาณที่มากเกินไปที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ระยะนี้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียยังต่ำอยู่ (33.36) เรียกระยะที่ไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนในสภาวะที่มีส่วนประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยาเพียงแค่นี้ (ไมโทคอนเดรีย, ออกซิเจนและสับสเตรท) ว่า state 4 respiration ระยะต่อไปของ oxygraph tracing เรียกว่า state 3 respiration ซึ่งเกิดเนื่องจากการเติม ADP+Pi ซึ่ง ADP+Pi ที่เติมลงไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP ขึ้น ($ADP+Pi \rightarrow ATP$) จึงพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเพิ่มสูงขึ้นมาก (211.28) จนกระทั่ง ADP ถูกใช้หมดไปในการทำปฏิกิริยา อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะช้าลง (33.36) กลับสู่ state 4 respiration ตามเดิม และการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP เรียกว่า ไมโทคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโทคอนเดรีย และเรียกค่าที่แสดงถึงการควบคุมการหายใจนี้ว่า respiratory control index (RCI) และเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly couple mitochondria หรือไม่ ซึ่งค่า RCI นี้จะคำนวณได้จากอัตราการหายใจใน state3 / อัตราการหายใจใน state4 ดังนั้น RCI ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองนี้จึงเท่ากับ $211.28 / 33.36 = 6.33$ และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติ

เป็น uncoupler จะทำให้การควบคุมการหายใจของไมโทคอนเดรียนี้เสียไป โดยที่ DNP สามารถกระตุ้นให้การควบคุมการหายใจของไมโทคอนเดรียนี้เสียไป DNP สามารถกระตุ้นให้มีการหายใจได้คล้าย state 3 respiration แม้ว่าจะไม่มี ADP อยู่ก็ตาม (ทำให้ไม่มีการสร้าง ATP) เรียกระยะนี้ว่า state 3u respiration ซึ่งมีผลทำให้ไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันไป จะเห็นได้จากอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะนี้สูงมาก (278.00) และการใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($O_2 \approx 0$)

tracing 16B แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนเพียงอย่างเดียว ไม่มีผลกระตุ้น state 4 respiration

tracing 16 C, 16D, 16E แสดงให้เห็นว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนสามารถกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 4 respiration ได้ในลักษณะเดียวกับ DNP คือ ในสภาวะที่ไม่มี ADP และสามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้มากขึ้นตามขนาดที่ใช้ กล่าวคือ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ขนาด 20 มก. ($23.86 \mu\text{M}$) สามารถกระตุ้น state 4 respiration ทำให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 94.52 นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที และเพิ่มเป็น 127.88 และ 144.56 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที เมื่อเพิ่มขนาดของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนเป็น 40 มก. ($47.72 \mu\text{M}$) และ 80 มก. ($95.44 \mu\text{M}$) แต่จะพบว่าหลังจากที่มีการกระตุ้น state 4 respiration แล้ว อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะลดลงโดยลดลงเป็น 27.80, 15.57 และ 13.90 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที เมื่อใช้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนขนาด 20, 40 และ 80 มก. ตามลำดับ (tracing 16C, 16D, 16E)

เมื่อเปลี่ยนสับสเตรทที่ใช้เป็น succinate 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนขนาด 20 มก. , 40 มก. และ 80 มก. จะกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้มากขึ้นตามขนาดที่ใช้ (รูปที่ 17) โดยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 จะเพิ่มขึ้นเป็น 116.76 (tracing 18C), 189.04 (tracing 17D) และ 189.04 (tracing 17E) นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที ตามลำดับ และหลังจากที่มีการกระตุ้น state 4 respiration แล้ว อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะลดลง โดยลดลงเป็น 27.80, 55.60 และ 50.04 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที (tracing 17C, 17D และ 17E ตามลำดับ) ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในทำนองเดียวกับเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วน tracing 17B แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนไม่มีผลกระตุ้น state 4 respiration

รูปที่ 18 แสดง Dose-response curve ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate (curve B) หรือ succinate (curve A) เป็นสับสเตรทในการกระตุ้น state 4 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามขนาดของสารที่ให้ จนกระทั่งที่ขนาดประมาณ 40 มก. ($47.72 \mu\text{M}$) จะกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้สูงสุด และเมื่อใช้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาดที่สูงกว่านี้ยังคงกระตุ้น state 4 respiration ได้ในอัตราที่ใกล้เคียงกับเมื่อใช้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนขนาด 40 มก.

2. ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์การกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน, ADP และ DNP

ในรูปที่ 19 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ขนาด 40 มก. ($47.72 \mu\text{M}$) ซึ่งเป็นขนาดที่กระตุ้น state 4 respiration ของไมโทคอนเดรียได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการหายใจที่ถูกกระตุ้นโดย 0.31 mM ADP และ 0.05 mM DNP แล้ว จะเห็นว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนสามารถกระตุ้นการหายใจได้ในอัตราที่ต่ำกว่าทั้ง ADP และ DNP กล่าวคือ มีค่าประมาณ 74.43 % ของ ADP และ 54.50 % ของ DNP ในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท และมีค่าประมาณ 77.82% ของ ADP และ 50.48 % ของ DNP เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

3. ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนขนาด 20 มก. ที่มีต่อดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และ อัตราส่วน ADP/O

3.1 กรณีที่ใช้ glutamate+ malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 20 tracing 20 A แสดงไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองว่ายังมี การควบคุมการหายใจที่ดีอยู่ เมื่อมีการเติม ADP + Pi และ DNP ($\text{RCI} = 7.71$ จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 = 103.45 นนอ. ออกซิเจน/นาที/มก. โปรตีน และอัตราส่วน ADP/O = 2.69) tracing 20B แสดงผลของ DMSO ในขนาดที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน 10 มก. ซึ่งไม่มีผลต่อคุณภาพของไมโทคอนเดรีย ($\text{RCI} = 7.71$, จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 = 103.45 นนอ. ออกซิเจน/นาที/มก. โปรตีนและอัตราส่วน ADP/O = 2.69) tracing 21C 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ในขนาด 20 มก. ($23.86 \mu\text{M}$) ทำให้ค่าพารามิเตอร์ทั้งสามเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับกรณีที่ใช้ DMSO กล่าวคือ ทำให้ค่า RCI ลดลงเป็น 1.66 จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O ลดลงเป็น 69.90 นนอ. ออกซิเจน/นาที/มก. โปรตีน และ 1.95 ตามลำดับ

3.2 กรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ทำการทดลองเช่นเดียวกับกรณี 3.1 แต่เปลี่ยนสับสเตรทเป็น succinate ผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนต่อค่าพารามิเตอร์ทั้งสามจะมีลักษณะคล้ายกับในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท กล่าวคือ ทำให้ค่า RCI ลดลงเป็น 1.38 จากเดิม 3.89 จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 ลดลงจาก 100.80 เป็น 58.44 นนอ. ออกซิเจน/นาท/มก. โปรตีน ค่าอัตราส่วน ADP/O ลดลงจาก 1.66 เป็น 1.33 ดังแสดงในรูปที่ 21

จากทั้งสองกรณี แสดงให้เห็นว่า 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน มีผลทำให้ค่าพารามิเตอร์ ต่าง ๆ ที่ใช้วัดการทำงานของไมโทคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไป โดยเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนมีผลลดค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$ (ตารางที่ 3 และ 4)

ผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

1. ผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนต่อ state 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย

เมื่อทดสอบกับ intact mitochondria

ทดสอบกับไมโทคอนเดรียที่เตรียมขึ้นตามวิธีปกติและมีคุณภาพดี ผั่งชั้นในของไมโทคอนเดรีย ยังคงมีคุณสมบัติเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) สับสเตรทที่ใช้มี 3 ชนิด แต่ละชนิดให้ reducing equivalent เข้าที่ complex ของลูกโซ่การหายใจที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน สับสเตรทดังกล่าว ได้แก่ glutamate + malate ให้ reducing equivalent (NADH) เข้าที่ complex I succinate ให้ reducing equivalent (FADH₂) เข้าที่ complex II และ ascorbate+TMPD ให้ reducing equivalent ที่ complex IV ของลูกโซ่การหายใจ เริ่มแรกเมื่อเติม DNP ลงใน chamber ที่มีไมโทคอนเดรีย incubate อยู่ใน incubation medium โดย DNP ทำหน้าที่เป็น uncoupler กระตุ้นการหายใจ state 3u (เกิดภาวะ uncoupling) จนไมโทคอนเดรียใช้ endogenous substrate หมด จึงเติม 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ขนาด 40 มก. (47.72 μ M) ลงไป incubate นาน 5 นาที แล้วใส่ substrate ให้เกิด state 3u ต่อไป จนปริมาณออกซิเจนใน chamber ลดลงเป็นศูนย์ เปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มควบคุม ซึ่งใช้ DMSO ปริมาตร 10 มล.

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่า 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ของ intact mitochondria เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ $p < 0.05$ โดยลดอัตราการใช้ออกซิเจนเฉลี่ยจากเดิม 55.90 ± 6.29 เป็น 21.56 ± 1.67 นนอ. ออกซิเจน/นาท./มก. โปรตีน และเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนก็ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u เช่นกัน โดยลดอัตราการใช้ออกซิเจนเฉลี่ยจากเดิม 34.68 ± 3.50 นนอ. ออกซิเจน/นาท./มก. โปรตีน เป็น 22.97 ± 3.96 นนอ. ออกซิเจน/นาท./มก. โปรตีน แต่พบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ และเมื่อใช้ ascorbate+TMPD เป็นสับสเตรท พบว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control โดยอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 120.69 ± 4.58 เป็น 123.00 ± 11.60 นนอ. ออกซิเจน/นาท./มก. โปรตีน

เมื่อทดสอบกับ osmotic-shocked mitochondria

ขั้นตอนการทดลองเริ่มโดยนำ osmotic-shocked mitochondria preincubate กับ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ขนาด 40 มคก. ($47.72 \mu\text{M}$) นาน 5 นาที แล้วจึงเติมสับสเตรทลงไปเพื่อให้เกิด state 3u จนไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนใน chamber หมด เปรียบเทียบผลเช่นเดียวกับกรณีที่ทดสอบกับ intact mitochondria

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาด 40 มคก. ($47.72 \mu\text{M}$) สามารถกระตุ้น state 3u ของ osmotic-shocked mitochondria โดยอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น จาก 46.44 ± 8.02 เป็น 76.16 ± 8.43 นนอ. ออกซิเจน/นาท./มก. โปรตีน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน มีผลกระตุ้น state 3u ของ osmotic-shocked mitochondria เล็กน้อย คือมีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นจาก 51.40 ± 4.57 เป็น 54.41 ± 5.57 นนอ. ออกซิเจน/นาท./มก. โปรตีน โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ แล้วพบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนใน state 3u เมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรทด้วย โดยที่อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นจาก 130.61 ± 10.27 เป็น 146.10 ± 7.71 นนอ. ออกซิเจน/นาท./มก. โปรตีน ซึ่งความแตกต่างนี้เป็นความแตกต่างที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$

ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อการออกซิไดซ์ NADH ใน intact mitochondria

รูปที่ 22 tracing 22A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรีย ที่ใช้ในการทดลอง tracing 22B เมื่อ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำลายของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน นานประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงเติม NADH พบว่า



NADH ไม่สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ อัตราการใช้ออกซิเจนยังคงมีค่า 27.80 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาทึ คงเดิม ทั้งนี้เนื่องจากไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองมีคุณสมบัติเป็น intact mitochondria tracing 22C เมื่อ preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนขนาด 40 มคก. (47.72 μM) นาน 5 นาที (ทั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจในระยะหลัง) จากนั้นจึงเติม NADH พบว่าสามารถออกซิไดซ์ NADH ได้ โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนหลังจากที่เติม NADH เพิ่มขึ้นจาก 5.56 เป็น 61.16 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาทึ

ผลของสารบางตัวและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบบางประการใน incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท เปรียบเทียบกับ DNP

1. ผลของ oligomycin

รูปที่ 23 tracing 23 B แสดงให้เห็นว่า oligomycin ในขนาด 10 มคก. สามารถยับยั้ง state 3 respiration ได้ ซึ่งจะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเติม ADP จะคงอยู่ที่ 27.80 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาทึ และเมื่อเติม DNP จะพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว มีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 305.80 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาทึ ทำนองเดียวกันใน tracing 23D เมื่อศึกษาถึงผลของ oligomycin ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาด 40 มคก. (47.72 μM) พบว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน สามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ของไมโทคอนเดรียได้ (150.12) นั่นคือ oligomycin ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการหายใจที่เกิดจาก 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน และ DNP

2. ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่ pH 7.2, 7.4 และ 7.6

รูปที่ 24 tracing 24A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ส่วน tracing 24B, 24C และ 24D แสดงผลเปรียบเทียบฤทธิ์ของ 0.05 mM DNP ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อถูก incubate อยู่ใน medium pH 7.2, 7.4 และ 7.6 ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะลดลงอย่างชัดเจน คือมีค่าเป็น 355.84, 289.12 และ 255.76 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาทึ ตามลำดับ เมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลองแล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเมื่อถูกกระตุ้นด้วย DNP ในกลุ่ม pH 7.2 มีความแตกต่างกับกลุ่ม pH 7.4 และกลุ่ม pH 7.6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (ตารางที่ 7) แสดงว่าในช่วง pH 7.2 - 7.6 นี้ DNP ออกฤทธิ์กระตุ้น state 4 respiration ได้น้อยลงเมื่ออยู่ใน pH ที่สูงขึ้น

รูปที่ 25 ทำการทดลองทำนองเดียวกับรูปที่ 24 แต่ใช้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน 40 มก. ($47.72 \mu\text{M}$) แทน DNP จากรูปที่ 25 จะเห็นว่า เมื่อ pH เพิ่มขึ้นจาก 7.2 เป็น 7.4 และ 7.6 อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียหลังจากได้รับ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน มีค่าเป็น 150.12, 144.56 และ 144.56 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ ตามลำดับ

ตารางที่ 8 แสดงว่าในช่วง pH 7.2 - 7.6 นี้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนออกฤทธิ์ กระตุ้น state 4 respiration ได้ทำให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนที่ใกล้เคียงกัน

3. ผลของ bovine serum albumin (BSA)

รูปที่ 26 tracing 26B เป็นการแสดงให้เห็นว่า การใส่ ADP + Pi หลังจากใส่ BSA 0.31mM ADP + 0.62mM Pi ยังคงสามารถกระตุ้นการเกิด state 3 respiration ได้ กล่าวคือ มีการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนจากการเติม ADP จาก 33.36 เป็น 216.84 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ และเมื่อ ADP ถูกใช้หมดไปอัตราการใช้ออกซิเจนจะต่ำลงเป็น 33.36 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ แสดงว่า BSA ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ ADP หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ BSA ไม่มีผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ไม่จับกับ ADP + Pi และ สับสเตรทที่ใช้ (glutamate + malate)

เมื่อทำการศึกษาผลของ BSA ในขนาดต่าง ๆ กันคือ 5, 10, 20 และ 30 มก. ต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียจะให้ผลดังแสดงใน tracing 26C จะเห็นว่า BSA ในขนาด 5 mg จะทำให้ฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ในการกระตุ้นหายใจของไมโทคอนเดรียลดลง คืออัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 150.12 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ เป็น 133.44 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ และจะลดลงมากขึ้นในขนาด 10, 20 และ 30 มก. คือมีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 122.32 94.52 และ 44.48 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ ตามลำดับ และฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจในระยะหลังมีค่าลดลงจาก 77.84 เป็น 99.72 61.16 52.82 และ 38.92 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการหายใจในระยะหลังนี้ลดลงตามฤทธิ์กระตุ้นการหายใจในระยะแรก ความแตกต่างของอัตราการใช้ออกซิเจนของทั้งสองระยะจึงลดน้อยลง ฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในระยะนี้จึงลดลง เมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า BSA ในขนาดต่าง ๆ มีผลลดฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจและฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน เมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มี BSA โดยเมื่อให้ BSA ในขนาด 20 และ 30 มก. จะสามารถลดฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจในระยะแรกและฤทธิ์ยับยั้งการหายใจในระยะหลังได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$ (ตารางที่ 9)

4. ผลของ DTNB และ DTT

4.1 ผลของ DTNB

รูปที่ 27 tracing 27B แสดงให้เห็นถึงผลของ DTNB ซึ่งเป็นสารประกอบพวก aromatic disulfide สามารถยับยั้งการเกิด state 3 respiration จากการเติม ADP ได้ จะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนยังคงอยู่ที่ 27.80 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ แต่เมื่อเติม 0.05mM DNP จะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น 172.36 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ DTNB ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจจากการเติม DNP ได้ tracing 27C แสดงถึงผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาด 40 มก. (47.72 μM) กระตุ้น state 4 respiration ของไมโทคอนเดรียทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นจาก 26.69 เป็น 161.24 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ tracing 27D เมื่อเติม 0.10 mM DTNB 1 นาทีก่อนจึงเติม 40 มก. 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะแรก จะเพิ่มขึ้นจาก 26.69 เป็น 100.08 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ และอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะหลังที่ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจมีค่าเปลี่ยนแปลงด้วย คือ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียมีค่าเปลี่ยนแปลงจาก 41.70 เป็น 47.26 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ จะเห็นว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน แสดงฤทธิ์กระตุ้นการหายใจในระยะแรกและยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียในระยะหลังได้ลดลง และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลองแล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า DTNB ทำให้ฤทธิ์ในการกระตุ้น state 4 respiration และฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$ (ตารางที่ 10)

4.2 ผลของ DTT

ผลการทดลอง ผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน แสดงไว้ในรูปที่ 28 พบว่า DTT ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ ADP และ DNP ที่เติมลงไป กล่าวคือจะไม่มีผลต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเลขอัตราการใช้ออกซิเจนจะไม่เปลี่ยนแปลง (tracing 28A, 28B) เมื่อเติม 1.04mM DTT ก่อนเติม 40 มก. (47.72 μM) 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนอัตราการใช้ออกซิเจนจะไม่เปลี่ยนแปลง และเมื่อเติม 0.31mM ADP + 0.62 mM Pi จะพบว่าไมโทคอนเดรียมีอัตราการใช้ออกซิเจนสูงขึ้นเป็น 200.16 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ และเมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะต่ำลงเป็น 33.36 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ ดัง tracing 28D เมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลองแล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ (ตารางที่ 11) และเมื่อเติม 1.04 mM DTT ในระยะหลังจากที่มีการกระตุ้น

state 4 respiration แล้ว พบว่า เมื่อเติม $0.31\text{mM ADP} + 0.62\text{ mM Pi}$ อัตราการใช้ ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย อัตราการใช้ ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่มี ค่าลดลงในระยะหลัง เป็น 33.36 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ ดังแสดงใน tracing 28E ซึ่ง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า อัตราการใช้ ออกซิเจนหลังเติม $\text{ADP} + \text{Pi}$ กรณีที่เติม DTT หลังจาก 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนแสดงฤทธิ์กระตุ้นการหายใจแล้วมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ (ตารางที่ 11)

ผลของสารบางตัวต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย ที่กระตุ้นให้มีการ ออกซิโดซ์ NADH โดย 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน

1. ผลของ DTT

รูปที่ 29 tracing 29A แสดงให้เห็นถึงผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนที่สามารถกระตุ้นให้ไมโทคอนเดรียออกซิโดซ์ NADH ได้ โดยมีอัตราการใช้ ออกซิเจนเป็น 61.16 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ tracing 29B แสดงให้เห็นถึง เมื่อเติม DTT ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้น จึงเติม 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนขนาด 40 มคก. ($47.72\text{ }\mu\text{M}$) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้ว เติม NADH พบว่า 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนไม่สามารถกระตุ้นให้ไมโทคอนเดรียออกซิโดซ์ NADH ได้ โดยอัตราการใช้ ออกซิเจนหลังจากเติม NADH มีค่าเป็น 19.46 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ เท่าเดิม เมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง หาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ข้อมูล ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี DTT อยู่ด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ (ตารางที่ 12)

tracing 29C แสดงผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ในระยะหลังที่ทำให้มีการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียต่อการออกซิโดซ์ NADH โดยทำ การ preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนนาน 5 นาที จากนั้นจึงเติม DTT และ NADH ตามลำดับ วัดอัตราการใช้ ออกซิเจนที่ไมโทคอนเดรีย ที่ใช้ในการออกซิโดซ์ NADH เปรียบเทียบกับใน tracing 29A ซึ่งเป็น control ที่ไม่มี DTT อยู่ในปฏิกิริยา พบว่าเมื่อเติม DTT ลงในปฏิกิริยา หลังจาก 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของ ไมโทคอนเดรียแล้ว DTT ไม่สามารถลดฤทธิ์ในการออกซิโดซ์ NADH ของไมโทคอนเดรียได้ มี อัตราการใช้ ออกซิเจนเป็น 61.16 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ ซึ่งมีค่าเท่ากับอัตราการใช้ ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในการออกซิโดซ์ NADH เมื่อไม่มี DTT อยู่ในปฏิกิริยา เมื่อทำการ ทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง หาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่าง กับกรณีที่ไม่มี DTT อยู่ในปฏิกิริยา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ (ตารางที่ 12)

2. ผลของ rotenone

รูปที่ 30 tracing 30A เป็น control แสดงถึงผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ขนาด 40 มก. ($47.72 \mu\text{M}$) ที่สามารถทำให้ไมโทคอนเดรียมีการออกซิไดซ์ NADH ได้โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 61.16 นนอ.ออกซิเจน/มล. /นาที่ tracing 30B และ 30C แสดงผลการให้ respiratory chain inhibitor site I คือ rotenone เพื่อศึกษาว่า rotenone จะมีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ที่ทำให้ไมโทคอนเดรียมีการออกซิไดซ์ NADH ได้หรือไม่ พบว่า เมื่อมี rotenone อยู่ในปฏิกิริยาไม่ว่าจะมีก่อนหรือหลัง 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียหลังเติม NADH มีค่าลดลงจากกรณีที่ไม่มี rotenone ในปฏิกิริยา โดยอัตราการใช้ออกซิเจนหลังเติม NADH ลดลงจาก 61.16 เป็น 17.79 , 16.68 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที่ เมื่อเติม rotenone ก่อนและหลังเติม 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ตามลำดับ เมื่อมี rotenone อยู่ในปฏิกิริยาจะสามารถลดฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย ที่กระตุ้นให้มีการออกซิไดซ์ NADH โดย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนนี้อยู่ในปฏิกิริยา โดยกรณีที่มี rotenone ในปฏิกิริยาก่อนและหลัง 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน หลังเติม NADH ไมโทคอนเดรียจะมีอัตราการใช้ออกซิเจนเฉลี่ยเป็น 9.10 ± 0.55 และ 12.51 ± 2.08 นนอ. ออกซิเจน/นาที่/มก. โปรตีน ตามลำดับ ส่วนกรณีที่ไม่มี rotenone ในปฏิกิริยา หลังเติม NADH ไมโทคอนเดรียจะมีอัตราการใช้ออกซิเจนเฉลี่ยเป็น 37.12 ± 1.73 นนอ. ออกซิเจน/นาที่/มก. โปรตีน (ตารางที่ 13)

ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

1. ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ตารางที่ 14 แสดงผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ 8-80 มก. ($6.14 - 61.49 \mu\text{M}$) ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย โดยวัดปริมาณ P_i ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP (ตามวิธีการในบทที่ 2) DMSO ในขนาด 10 มล. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ไม่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สาร 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาด 8-80 มก. ($6.14 - 61.49 \mu\text{M}$) สามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้มากขึ้น และเมื่อกระตุ้นในระดับหนึ่งแล้วจะเริ่มกระตุ้นได้คงที่เมื่อใช้ขนาดมากกว่า 40 มก. ขึ้นไป ดังแสดงใน dose - response curve ในรูปที่ 31 โดยจากตารางที่ 14 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาด 8 มก. ($6.14 \mu\text{M}$) สามารถกระตุ้น ATPase ทำให้มีการสลายตัวของ ATP และมีการปลดปล่อย P_i ออก



มา 0.2275 มคม. / มก. โปรตีน/10 นาที และจะมีการปลดปล่อย Pi เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ตามขนาดของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน คือในขนาด 40 , 48 , 64 และ 80 มก. จะมีกระตุ้นให้มีการปลดปล่อย Pi เป็น 1.130 , 1.250, 1.3900 และ 1.4175 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ตามลำดับ

2. ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ได้สูงสุดระหว่าง 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน และ DNP

เปรียบเทียบการกระตุ้น ATPase activity โดย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน และ DNP จะเห็นว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาด 80 มก. ($61.49 \mu\text{M}$) สามารถกระตุ้น ATPase ทำให้มีการปลดปล่อย Pi ได้ประมาณ 1.3775 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ส่วน 0.10 mM DNP สามารถกระตุ้น ATPase ทำให้มีการปลดปล่อย Pi ประมาณ 1.8925 มคม. /มก.โปรตีน /10 นาที 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนสามารถกระตุ้น ATPase ได้ประมาณ 72.79% ของ DNP (รูปที่ 32)

ผลของสารบางตัวและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบบางประการใน incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเปรียบเทียบกับ DNP

1. ผลของ oligomycin และ atractyloside

ตารางที่ 15 แสดงผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย กรณีที่ไม่ได้เติมสารใดเลยจะพบว่ามี ATPase activity ต่ำ Pi ที่ปลดปล่อยมีค่าประมาณ 0.1675 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้ โดยทำให้มีการสลายตัวของ ATP ไปเป็น ADP + Pi ได้อย่างมาก Pi ที่ปลดปล่อยมีค่า 1.8925 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ส่วน 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ในขนาด 32 มก. ($24.60 \mu\text{M}$) ก็ให้ผลในการกระตุ้น ATPase activity เช่นเดียวกับ DNP ทำให้มี Pi ปลดปล่อยออกมา 0.6950 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที เมื่อศึกษาถึงผลของการใช้ oligomycin ร่วมกับ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน จะทำให้มี Pi ปลดปล่อยมา 0.3950 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที และเมื่อให้ atractyloside ร่วมกับ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนจะทำให้มี Pi ปลดปล่อยมา 0.5000 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ซึ่งเป็นผลที่คล้ายคลึงกับเมื่อใช้ 0.10 mM DNP ร่วมกับ oligomycin และ atractyloside โดยจะทำให้มี Pi ปลดปล่อยออกมาลดน้อยลงเป็น 0.4550 และ 0.8175 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ตามลำดับ

2. ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่ pH 6.8, 7.2 และ 7.6

ตารางที่ 16 แสดงผลในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH 6.8, 7.2 และ 7.6 ในกรณีที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ พบว่าให้ผลในการกระตุ้น ATPase activity ได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ P_i ที่ถูกปลดปล่อยมีค่าเฉลี่ย 0.1750, 0.1675 และ 0.1775 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ตามลำดับ กรณีของ DMSO ที่ใช้เป็นตัวแทนละลายของ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน ก็ให้ผลในการทำงานเหมือนกัน ส่วน 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนนสามารถกระตุ้น ATPase ใน medium ที่มี pH 6.8, 7.2 และ 7.6 ให้มีการปลดปล่อย P_i เป็น 0.7550, 0.6950 และ 0.6875 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ตามลำดับ และในกรณีของ DNP ก็สามารถกระตุ้น ATPase ใน medium ที่มี pH เดียวกันนี้ ทำให้มี P_i ปลดปล่อยออกมาเป็น 1.9800, 1.8925 และ 1.7750 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ซึ่งปริมาณ P_i ที่ถูกปลดปล่อยลดลงเมื่ออยู่ใน incubation medium ที่มี pH สูงขึ้นนี้มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ทั้งกรณีของ DNP และ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน

3. ผลของ DTNB และ DTT

ตารางที่ 17 แสดงผลในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย กรณีที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ พบว่าจะมี ATPase activity ต่ำ P_i ที่ถูกปลดปล่อยมีค่า 0.1675 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที และ DMSO ก็ให้ผลทำงานเหมือนกัน ในขณะที่ 0.10 mM DTNB มีฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ได้ทำให้มีการปลดปล่อย P_i ออกมา 0.4125 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ส่วน 1.01 mM DTT สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้เพียงเล็กน้อย การเติม DTT ลงไปมีผลยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ที่เกิดจาก DTNB ได้ P_i ที่ถูกปลดปล่อยมีค่าประมาณ 0.3600 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที ผลของ DTNB ต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน ในขนาด 32 มคก. (24.60 μ M) พบว่า มีผลกระตุ้นการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย อย่างเห็นได้ชัด P_i ที่ถูกปลดปล่อยมีค่าเพิ่มเป็น 1.3325 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที และพบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน ในการกระตุ้น ATPase activity พบว่า DTT มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน ทำให้ P_i ถูกปลดปล่อยมีค่าลดลงเป็น 0.3450 มคม. /มก. โปรตีน/10 นาที พบว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ (ตารางที่ 17)

ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity

รูปที่ 33 tracing 33A แสดง การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย กลุ่มควบคุมซึ่งเติม DMSO 10 มล. ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาที ก่อนเติม tyramine จะเห็นว่าไมโตคอนเดรียมีอัตราการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ tyramine เท่ากับ 22.24 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที เมื่อเติม pargyline ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาที ก่อนเติม tyramine (tracing 33B) จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจน หลังเติม tyramine มีค่าเป็น 5.56 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที tracing 33C และ 33D แสดงผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาด 40 มคก. (47.72 μ M) และ 80 มคก. (95.44 μ M) ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ tyramine ทำให้ไมโตคอนเดรียมีอัตราการใช้ออกซิเจนหลังเติม tyramine เป็น 22.24 นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที ซึ่งเท่ากับเมื่อใช้ DMSO ทดสอบ

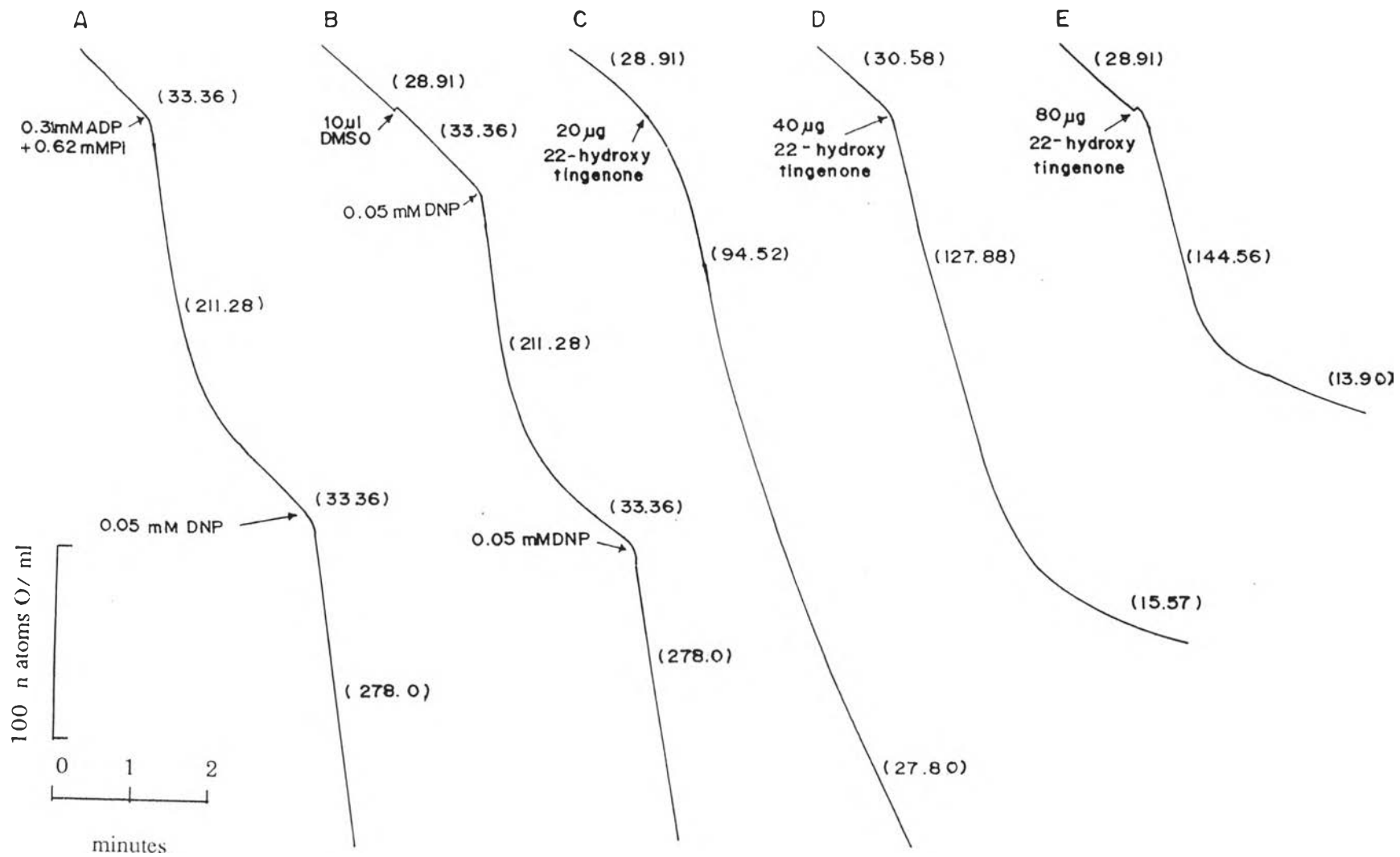
ตารางที่ 18 แสดงผลของ pargyline และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อการออกซิไดซ์ tyramine พบว่า pargyline สามารถยับยั้งการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนที่เกิดจาก tyramine ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการกระตุ้นการหายใจที่เกิดจาก tyramine ในการทดลองนี้เป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ MAO ส่วน 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนไม่มีผลต่อการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ tyramine

รูปและตารางประกอบผลการวิจัย

รูปที่ 16 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงิจิโนน ในขนาด 20, 40 และ 80 มคก. ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย 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 และไมโทคอนเดรีย 2.09 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, 22-ไฮดรอกซีทีงิจิโนน ความเข้มข้น 23.86, 47.72 และ 95.44 μM และ DMSO ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

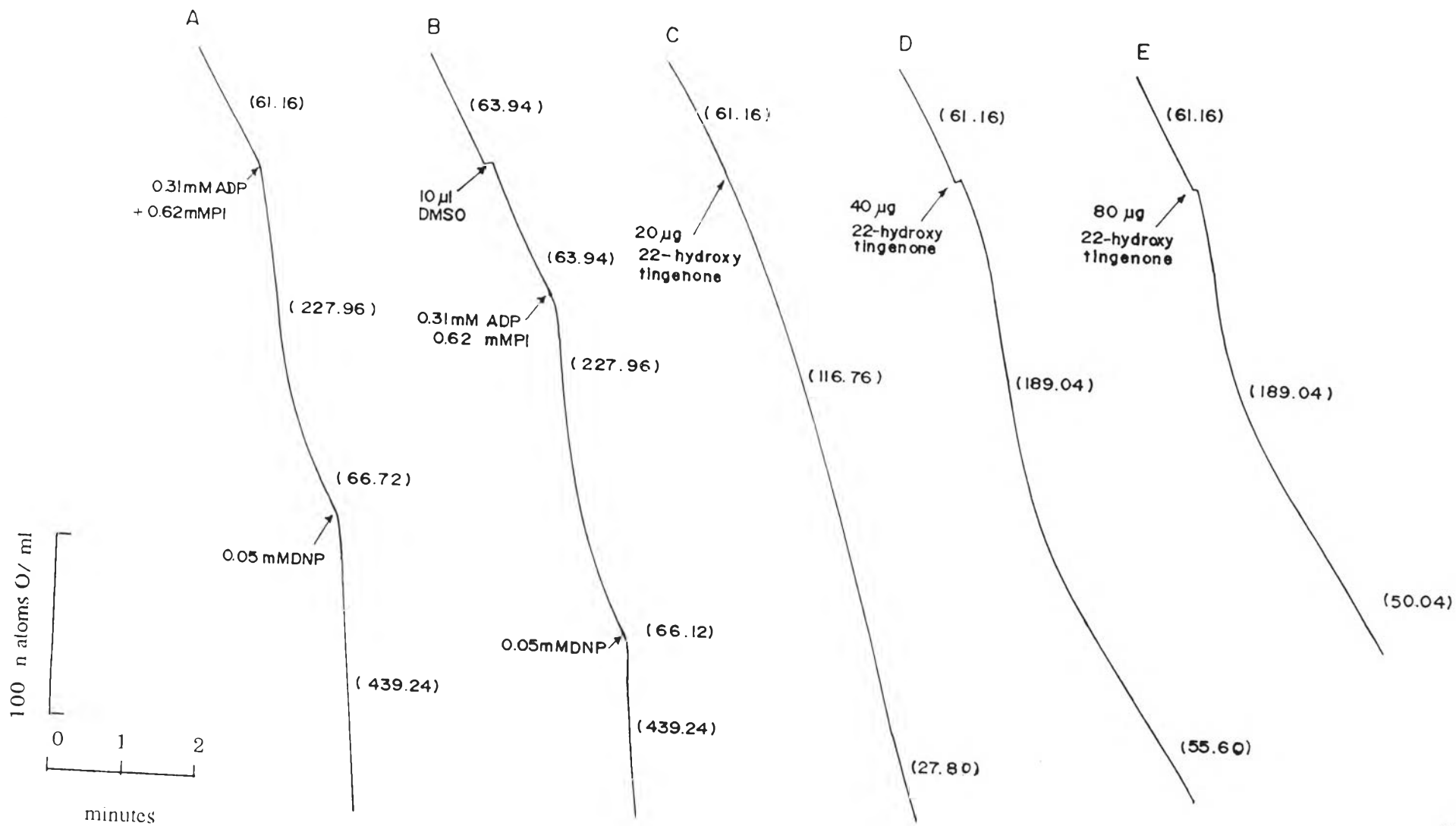
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที



รูปที่ 17 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ในขนาด 20, 40 และ 80 มคก. ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย 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 1.96 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ความเข้มข้น 23.86, 47.72 และ 95.44 μM และ DMSO ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

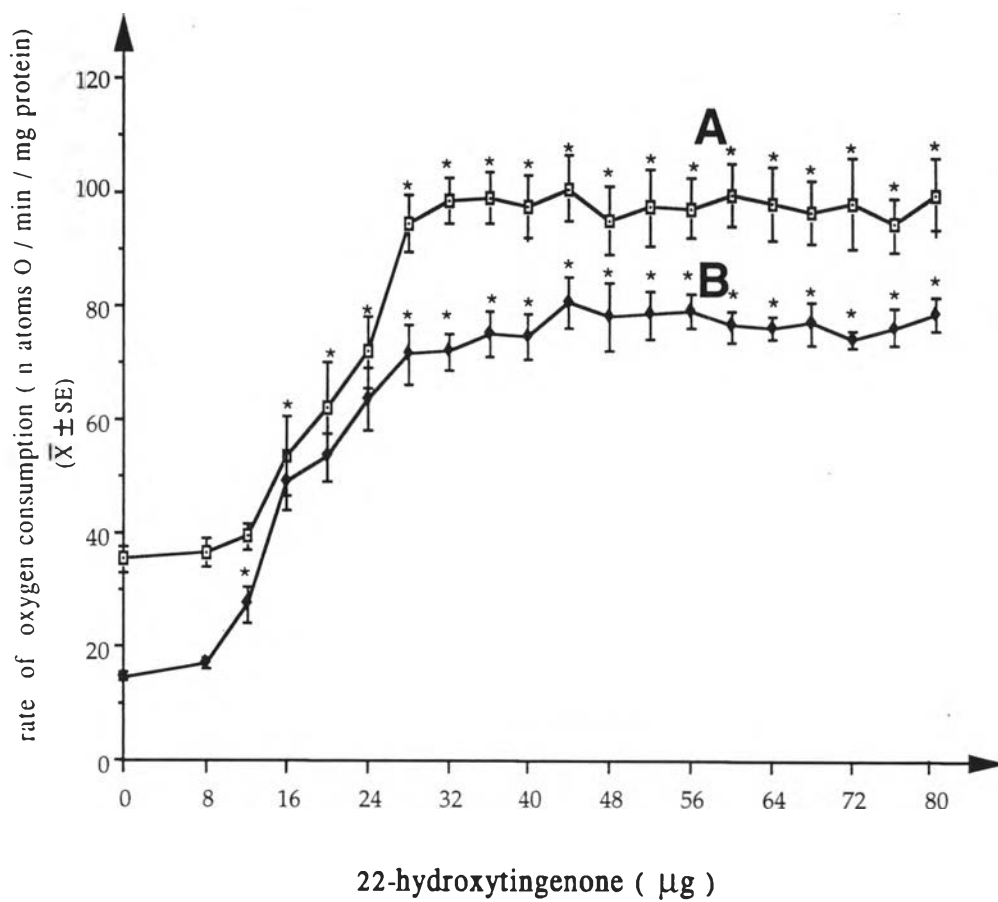
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที



รูปที่ 18 Dose-response curve ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate (curve A) และ glutamate+malate (curve B) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate (กรณีของ curve A), 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate (กรณีของ curve B), 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย เฉลี่ย 1.83 มก. โปรตีน/ มล. , 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เติมตามลงไปอีกตั้งแสดงไว้ในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



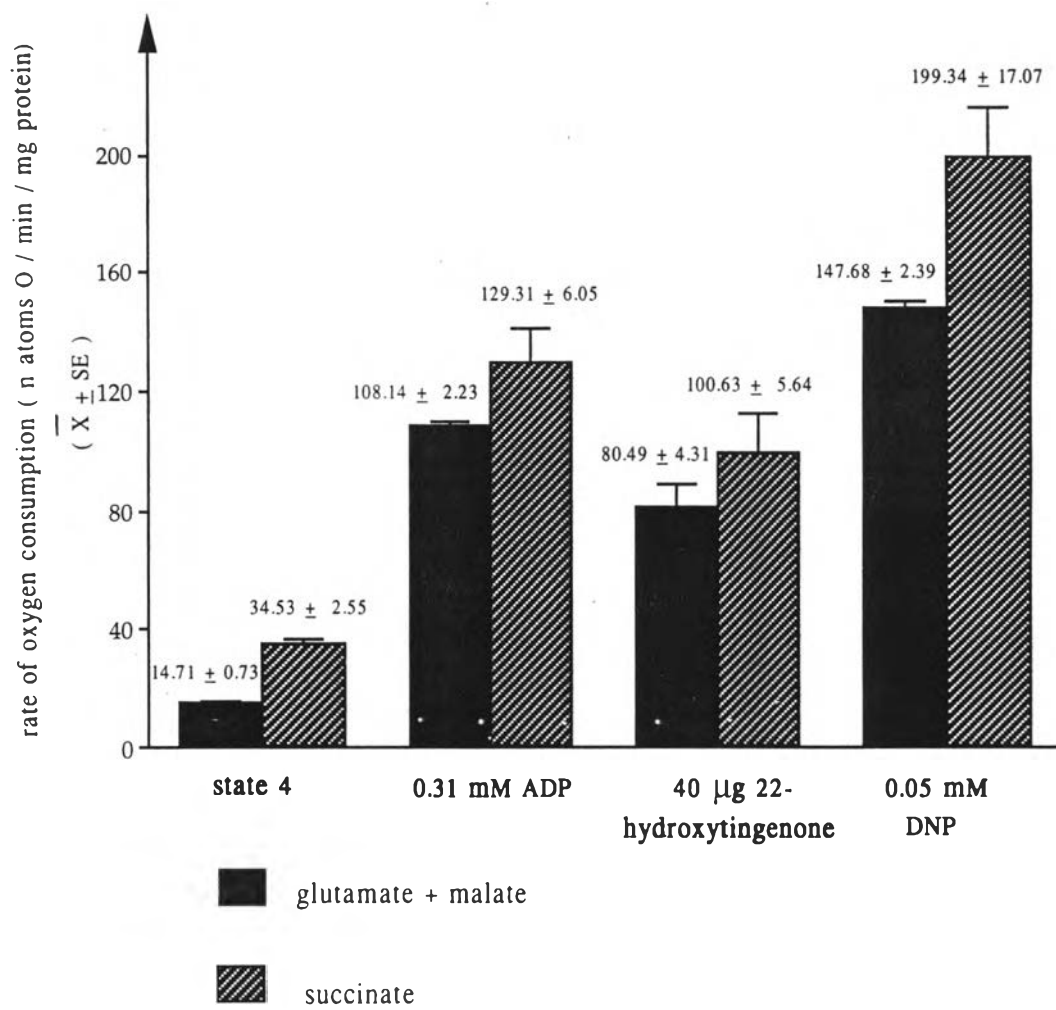
* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

A : succinate
B : Glutamate + malate

รูปที่ 19 ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน, ADP และ DNP เมื่อใช้ glutamate+ malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate หรือ 5.21mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงที่แทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



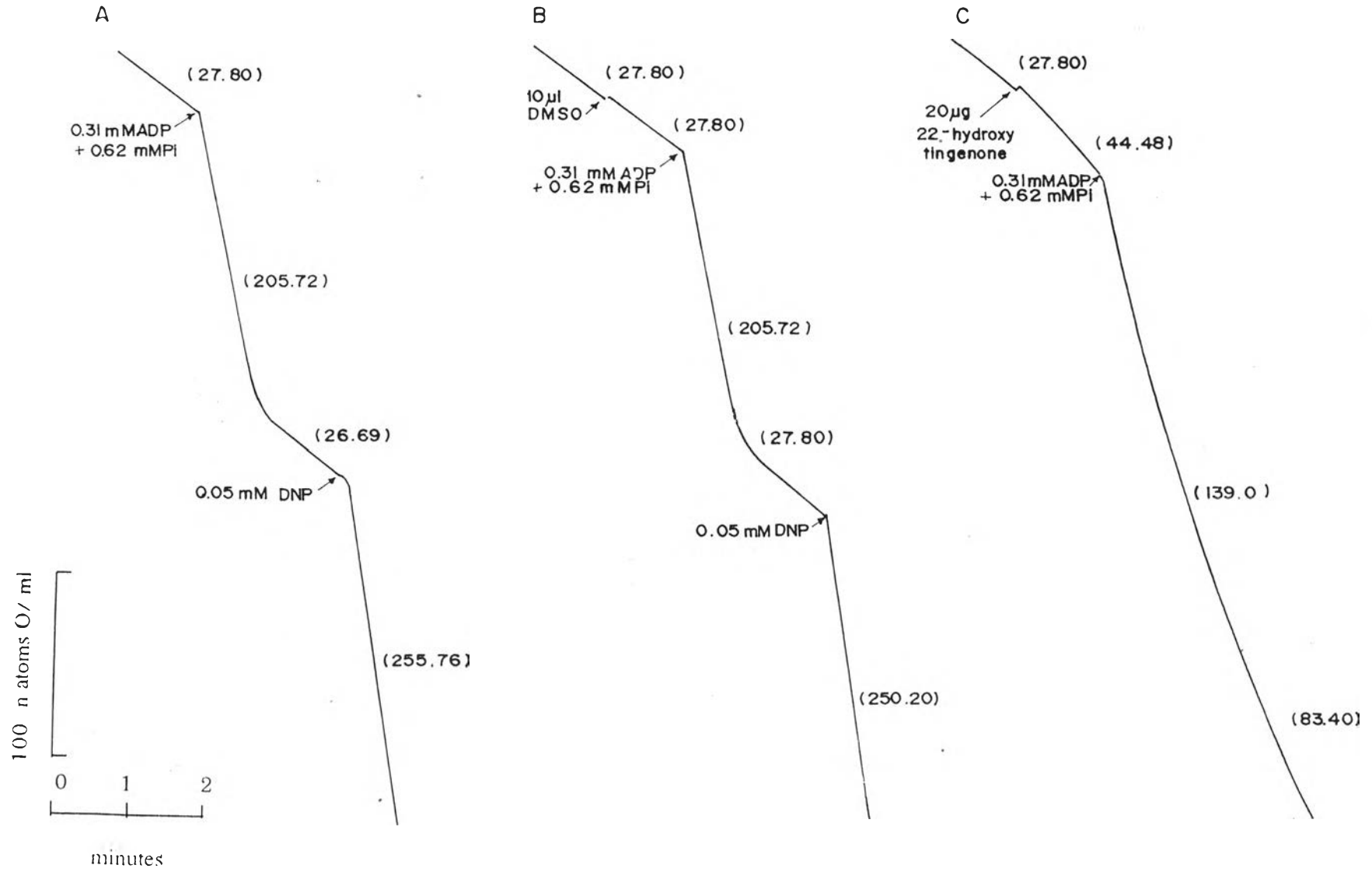
รูปที่ 20 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจิงโนน ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 ไมโทคอนเดรีย และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 1.98 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, 22-ไฮดรอกซีทิงจิงโนน ความเข้มข้น 23.86 μ M และ DMSO ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที

ผลการคำนวณค่าต่าง ๆ ดังกล่าวจาก tracing A, B และ C ดังแสดงเปรียบเทียบไว้ในตาราง ดังนี้

| ตัวแปร | tracing | | |
|--|------------|----------|--|
| | control(A) | DMSO (B) | 20 μ g 22-hydroxy tingenone(C) |
| ดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) | 7.71 | 7.71 | 1.66 |
| จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 (นนอ. ออกซิเจน/ นาที/มก. โปรตีน) | 103.45 | 103.45 | 69.90 |
| อัตราส่วน ADP/O | 2.69 | 2.69 | 1.95 |



ตารางที่ 3 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจิโนน ต่อ state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท เทียบกับเมื่อไม่ใช้ 22-ไฮดรอกซีทิงจิโนนพารามิเตอร์ที่ใช้เปรียบเทียบ คือ ดัชนีควบคุมการหายใจ(RCI) จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O

| Experiments | RCI | state 3 oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) | ADP/O |
|--------------------------------------|------------------|---|------------------|
| control | 8.08 \pm 0.64 | 118.00 \pm 6.65 | 2.50 \pm 0.11 |
| after 20 μ g 22-hydroxytingenone | 1.45 \pm 0.08* | 68.52 \pm 4.71* | 1.95 \pm 0.03* |
| % change | 82.05 | 58.06 | 21.15 |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.03 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP และ 22-ไฮดรอกซีทิงจิโนน ความเข้มข้น 23.86 μ M ปริมาตร ทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



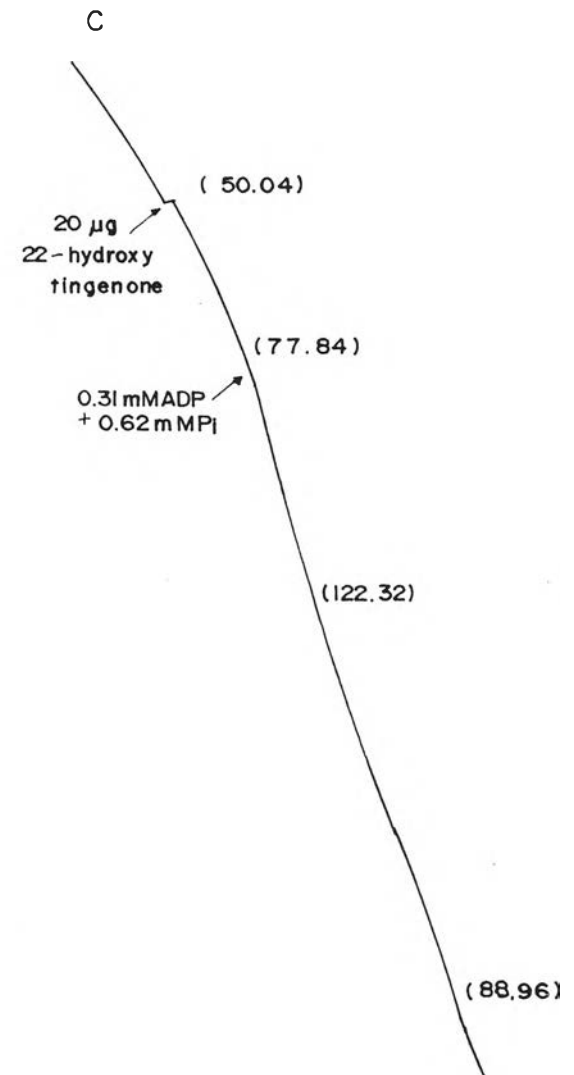
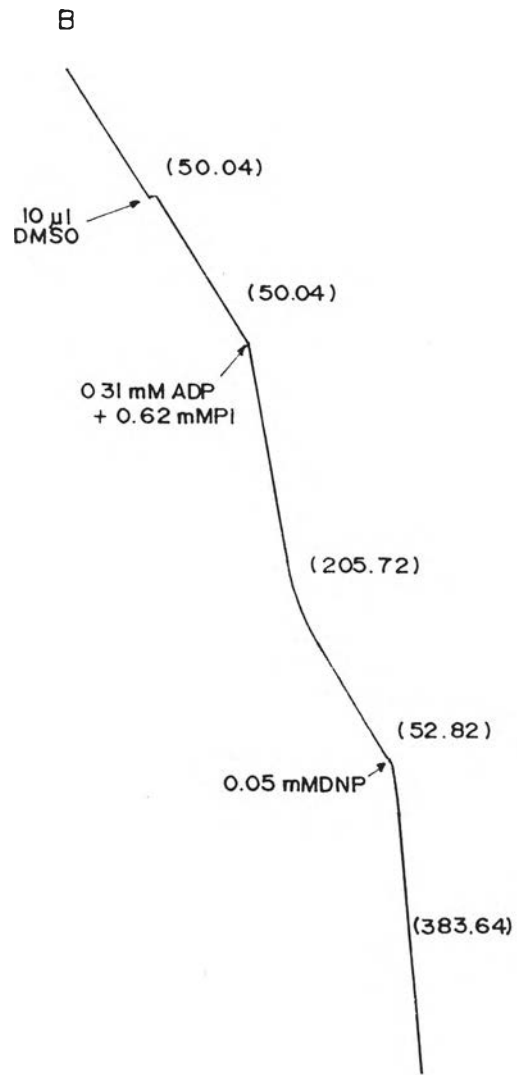
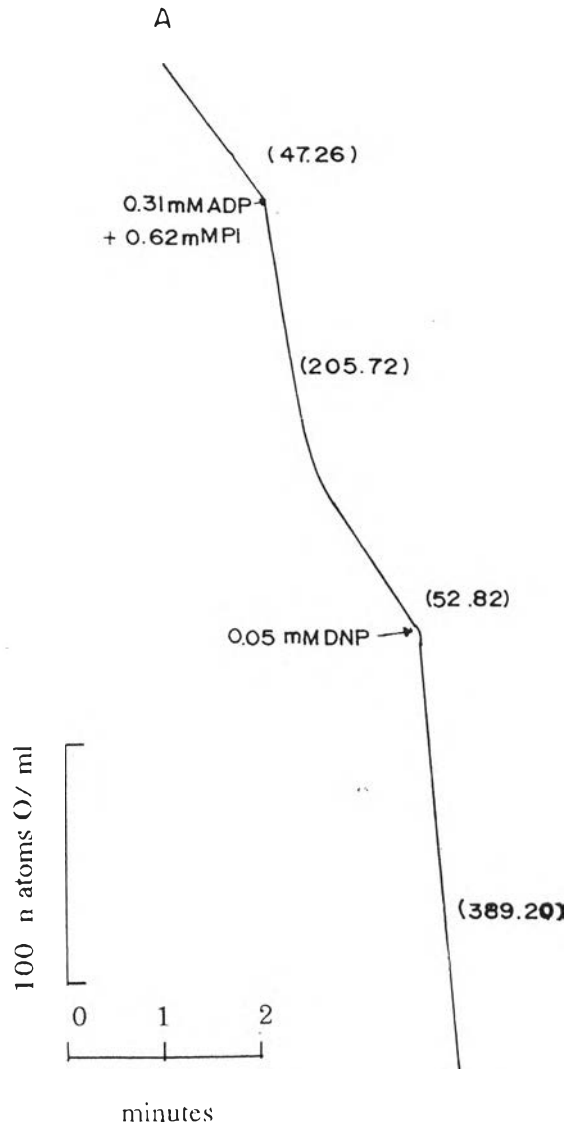
รูปที่ 21 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจิโนน ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 ไมโตคอนเดรียและ อัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ succinate เป็น สับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 2.08 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, DMSO และ 22-ไฮดรอกซีทิงจิโนน ความเข้มข้น 23.86 μ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที

ผลการคำนวณค่าต่าง ๆ ดังกล่าวจาก tracing A, B และ C ดังแสดงเปรียบเทียบไว้ในตาราง ดังนี้

| ตัวแปร | tracing | | |
|--|------------|----------|--|
| | control(A) | DMSO (B) | 20 μ g 22-hydroxy tingenone (C) |
| ดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) | 3.89 | 3.89 | 1.38 |
| จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 (นนอ. ออกซิเจน/ นาที/มก. โปรตีน) | 100.80 | 100.80 | 58.44 |
| อัตราส่วน ADP/O | 1.66 | 1.66 | 1.13 |



ตารางที่ 4 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีนอน ต่อ state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท เทียบกับเมื่อไม่ใช้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีนอน พารามิเตอร์ที่ใช้เปรียบเทียบ คือ ดัชนีความคุมการหายใจ(RCI) จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O

| Experiments | RCI | state 3 oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) | ADP/O |
|--------------------------------------|------------------|---|------------------|
| control | 4.21 \pm 0.20 | 116.87 \pm 9.28 | 1.54 \pm 0.07 |
| after 20 μ g 22-hydroxytingenone | 1.50 \pm 0.24* | 79.58 \pm 6.15 NS | 1.10 \pm 0.02* |
| % change | 64.37 | 30.99 | 28.57 |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS = p>0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.03 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีนอน ความเข้มข้น 23.86 μ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 5 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีนอน ต่อ state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate+malate , succinate และ ascorbate+TMPD เป็นสับสเตรท

| substrate | rate of state 3u respiration (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) | |
|--------------------|--|---------------------------------|
| | control | 40 μ g 22- hydroxytingenone |
| glutamate + malate | 55.90 \pm 6.29 | 21.56 \pm 1.67 * |
| succinate | 34.68 \pm 3.50 | 22.97 \pm 3.96 NS |
| ascorbate + TMPD | 120.69 \pm 4.58 | 123.00 \pm 11.60 NS |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS = p>0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate หรือ 5.21 mM succinate หรือ 2.08 mM ascorbate + 0.52 mM TMPD, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.03 มก. โปรตีน/ มล. เติม DNP ลงไปใน chamber ก่อน จึงเติม 22-ไฮดรอกซีทิงจีนอน ความเข้มข้น 47.72 μ M แล้ว incubate นาน 5 นาที จึงใส่ สับสเตรท ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 6 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ต่อ state 3u respiration ของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH , succinate และ ascorbate+TMPD เป็นสับสเตรท

| substrate | rate of state 3u respiration (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) | |
|------------------|--|---------------------------------|
| | control | 40 μ g 22- hydroxytingenone |
| NADH | 46.44 \pm 8.02 | 76.16 \pm 8.43 * |
| succinate | 51.40 \pm 4.57 | 54.41 \pm 5.51 NS |
| ascorbate + TMPD | 130.61 \pm 10.27 | 146.10 \pm 7.71 NS |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS = p>0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

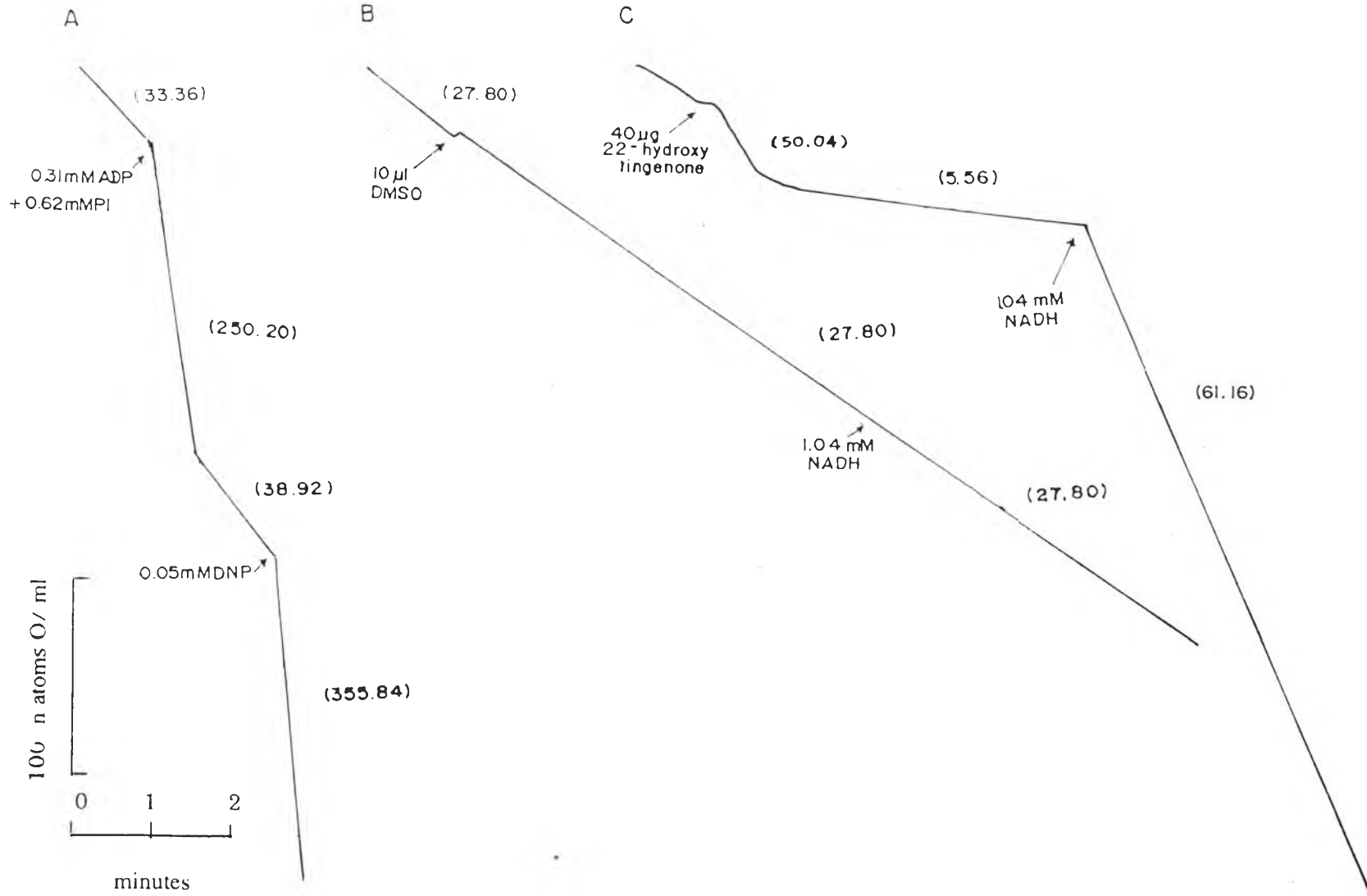
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 27.66 mM KCl, 1.04 mM NADH หรือ 5.21 mM succinate หรือ 2.08 mM ascorbate + 0.52 mM TMPD, 0.05 mM DNP, 0.52 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเจลลี่ 2.02 มก. โปรตีน / มล. เติม 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 μ M แล้ว incubate นาน 5 นาที จึงใส่ สับสเตรท ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 22 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนนต่อการออกซิไดซ์ NADH ของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน ความเข้มข้น 47.72 μ M DMSO และ NADH ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

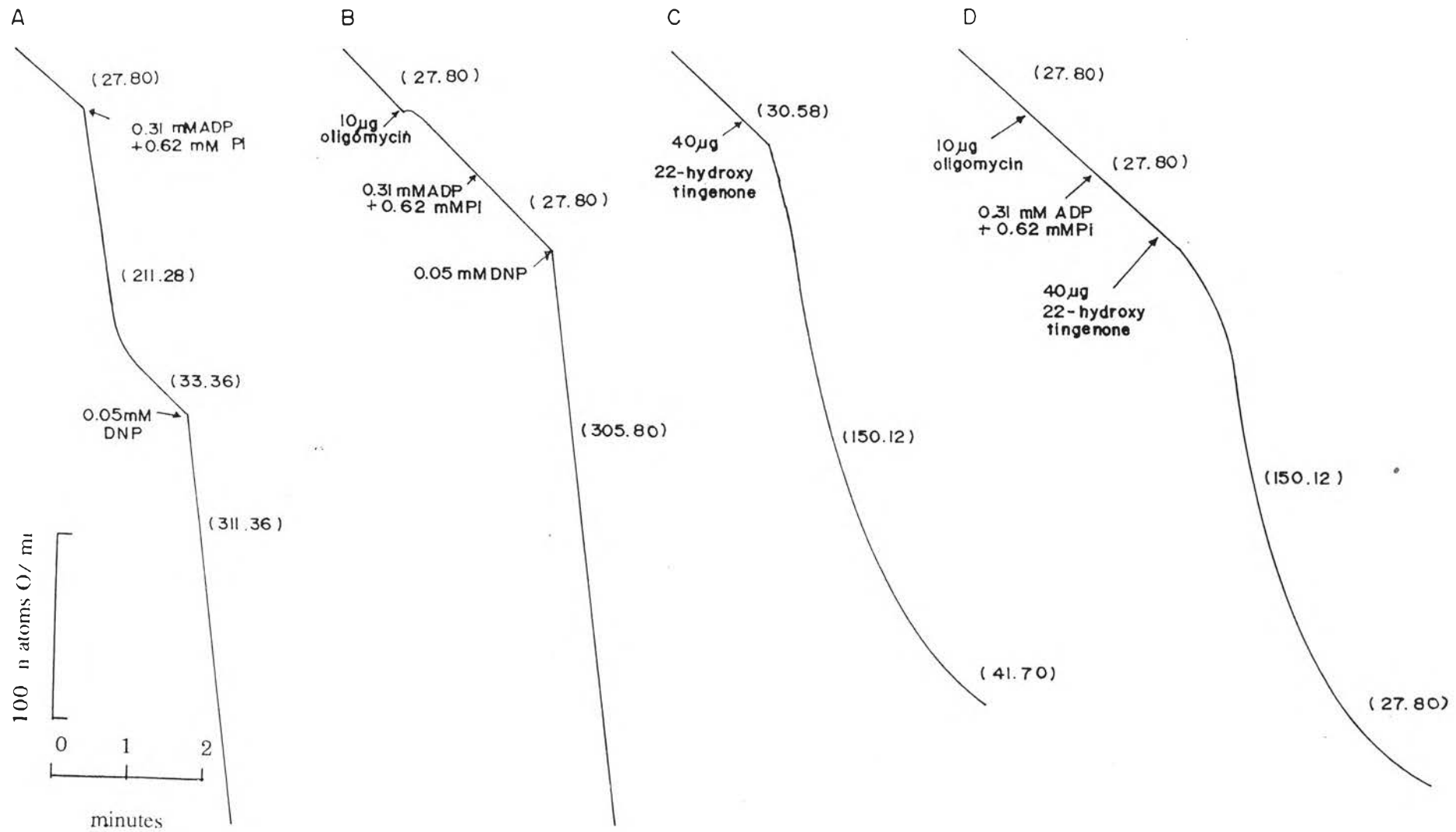
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที



รูปที่ 23 ผลของ oligomycin ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP และ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

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 และไมโทคอนเดรีย 1.97 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, oligomycin และ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 μM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที

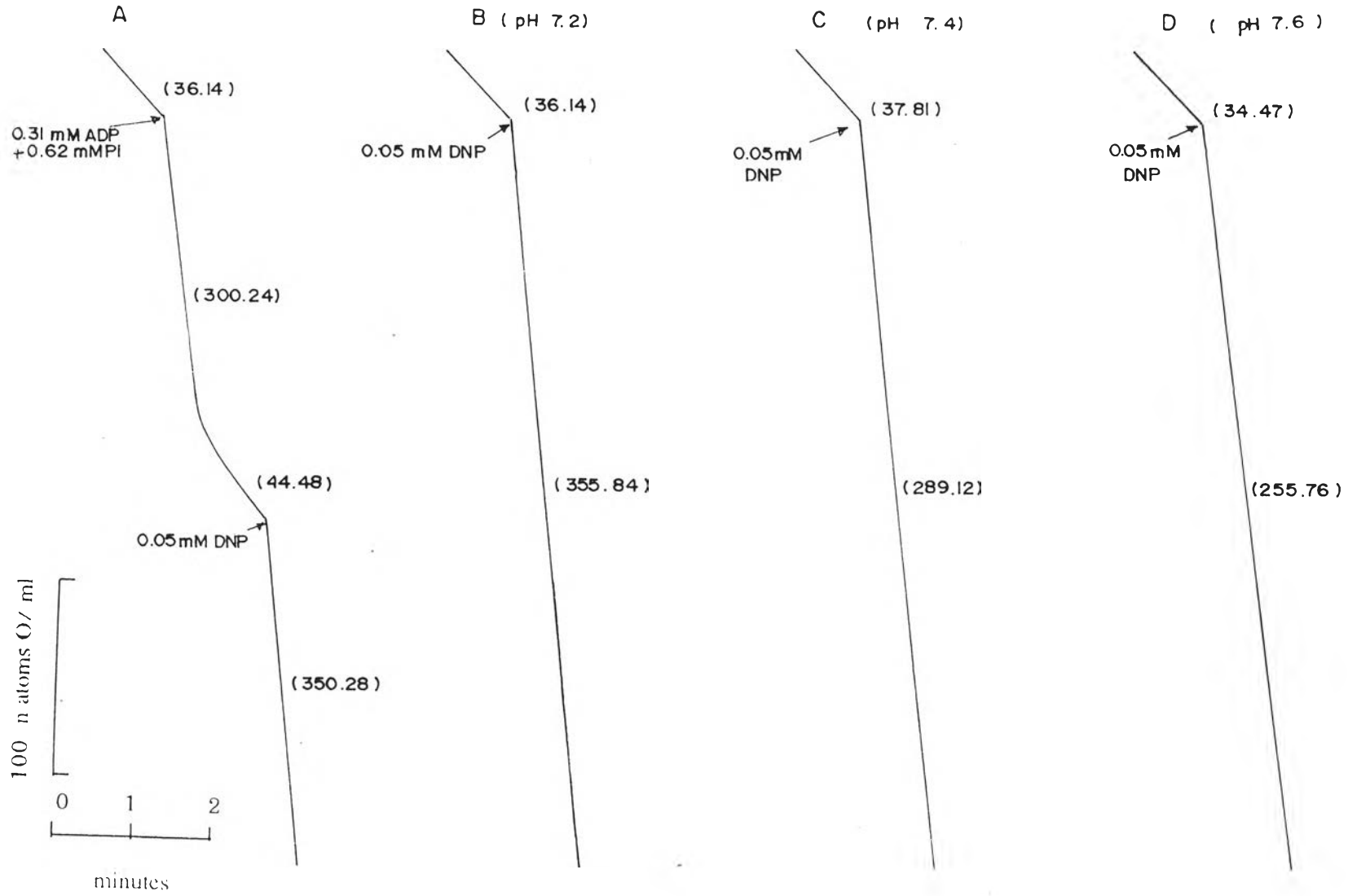




รูปที่ 24 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl pH 7.2 (tracing A และ B) pH 7.4 (tracing C) และ pH 7.6 (tracing D), 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรีย 2.08 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP และ DNP ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที



ตารางที่ 7 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of oxygen consumption after 0.05 mM DNP (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) |
|------------------|--|
| pH 7.2 (control) | 180.99 \pm 4.10 |
| pH 7.4 | 149.04 \pm 5.51 * |
| pH 7.6 | 131.34 \pm 4.55 * |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

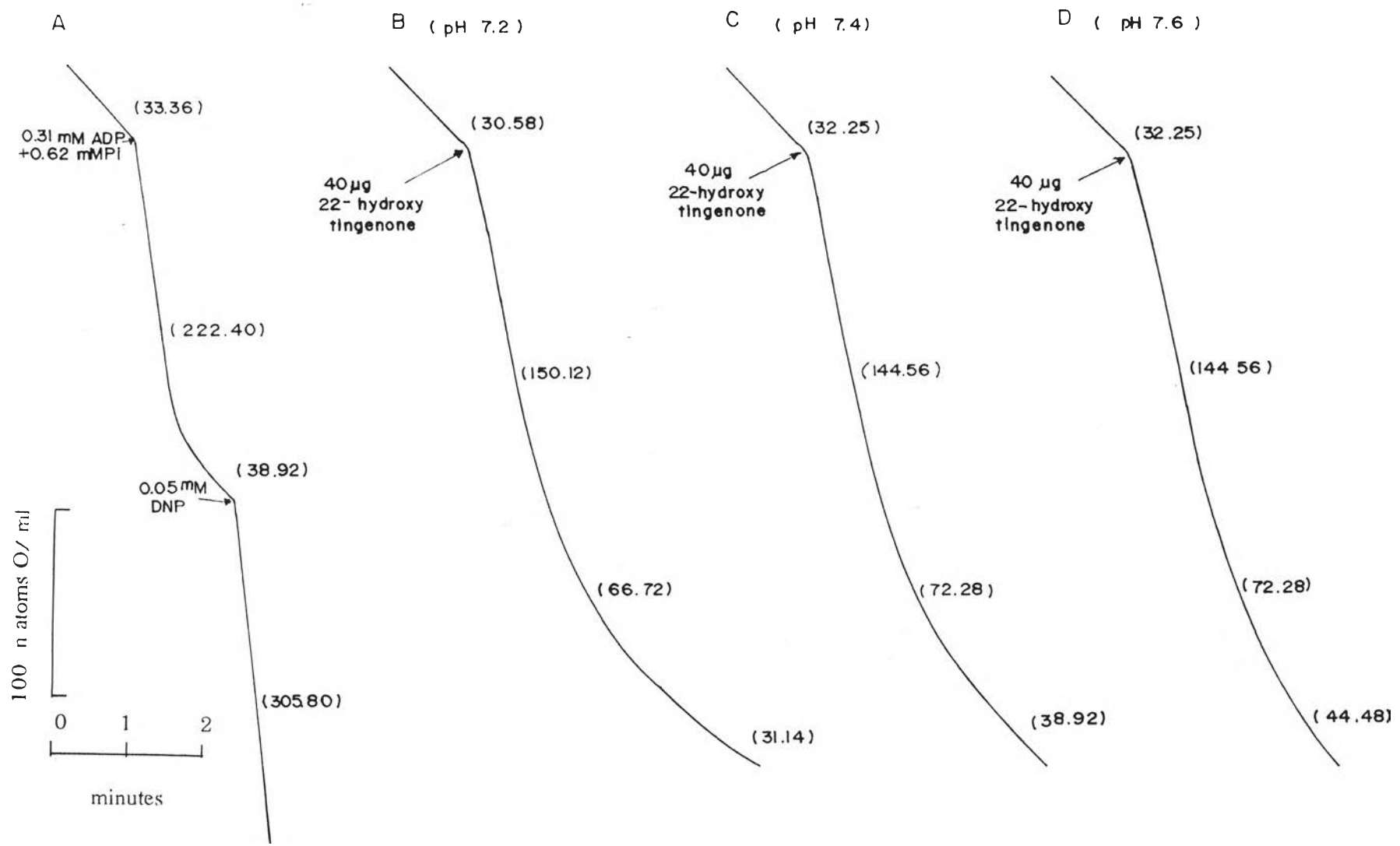
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl pH 7.2 pH 7.4 และ pH 7.6 , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.01 มก. โปรตีน/ มล. ความเข้มข้นของ DNP ที่เติมตามลงไป ดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 25 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl pH 7.2 (tracing A และ B) pH 7.4 (tracing C) และ pH 7.6 (tracing D), 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรีย 1.98 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP และ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 μM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที



ตารางที่ 8 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of oxygen consumption after 40 μ g 22-hydroxytyingone (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) |
|------------------|--|
| pH 7.2 (control) | 64.90 \pm 4.67 |
| pH 7.4 | 64.94 \pm 5.32 NS |
| pH 7.6 | 65.94 \pm 4.82 NS |

n = 4 NS = p>0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl pH 7.2 pH 7.4 และ pH 7.6 , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.03 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 μ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 26 ผลของ Bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

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 และไมโทคอนเดรีย 1.83 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, BSA และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 μM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที

ตารางที่ 9 ผลของ Bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจันโนน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of oxygen consumption after 40 μ g 22-hydroxytingenone (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) | |
|--|---|--|
| | 1 st rate (rate of stimulation) | 2 nd rate (rate of inhibition) |
| no BSA (control) | 80.29 \pm 1.78 | 39.20 \pm 2.20 |
| BSA 5 mg + 40 μ g 22-hydroxytingenone | 68.49 \pm 5.15 NS | 41.17 \pm 4.67 NS |
| BSA 10 mg + 40 μ g 22-hydroxytingenone | 68.41 \pm 4.67 NS | 35.45 \pm 1.10 NS |
| BSA 20 mg + 40 μ g 22-hydroxytingenone | 49.04 \pm 6.62 * | 28.91 \pm 1.77 * |
| BSA 30 mg + 40 μ g 22-hydroxytingenone | 35.57 \pm 7.02 * | 22.64 \pm 1.88 * |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS = p>0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.93 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ ADP, DNP, BSA และ 22-ไฮดรอกซีทิงจันโนนความเข้มข้น 47.72 μ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

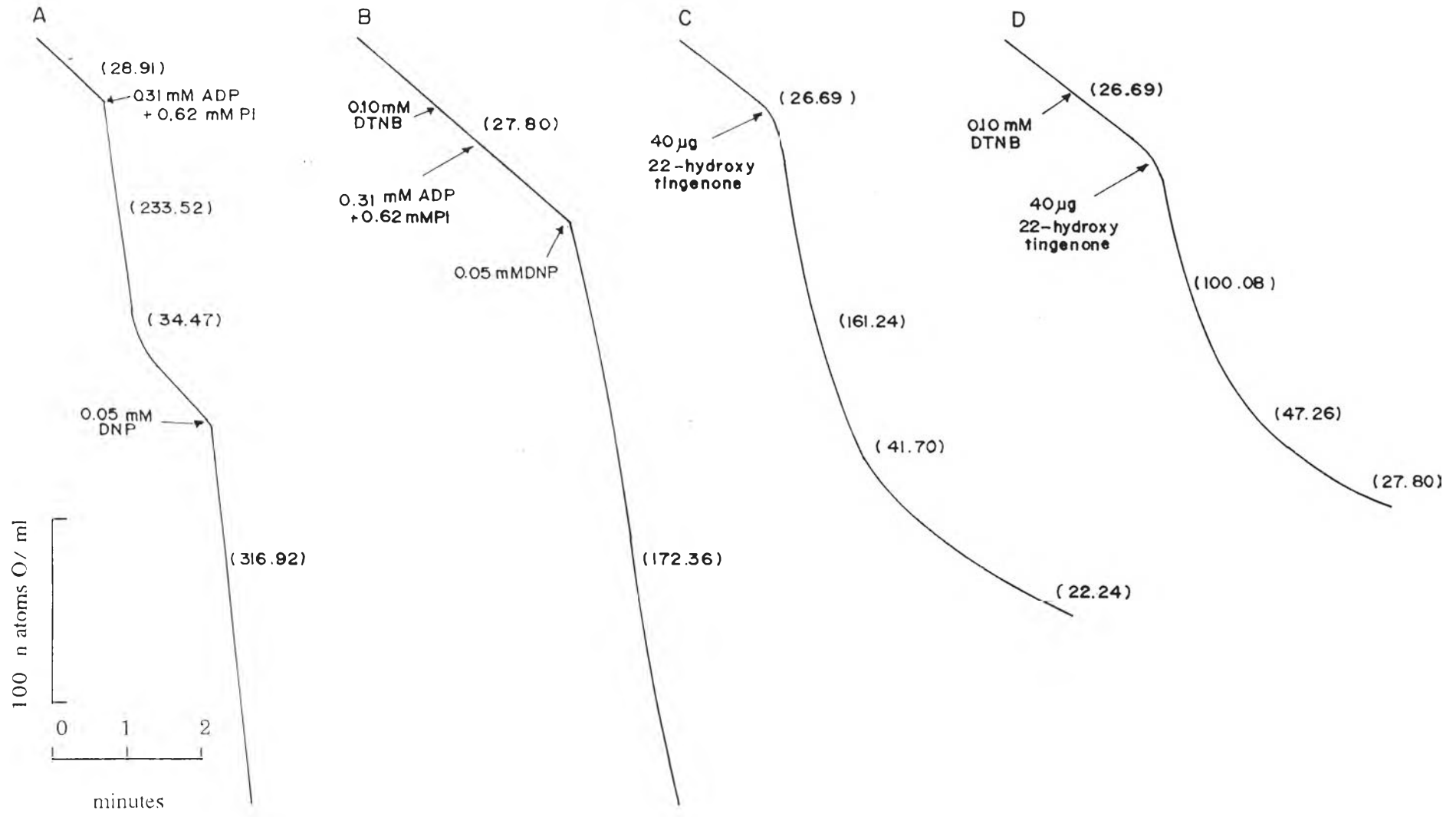
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 27 ผลของ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน ต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย

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 และไมโตคอนเดรีย 1.93 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, DTNB และ 22-ไฮดรอกซีทีงจิโนน ความเข้มข้น 47.72 μM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที





ตารางที่ 10 ผลของ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of oxygen consumption after 40 μ g 22-hydroxytyingene (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) | |
|--|---|--|
| | 1 st rate (rate of stimulation) | 2 nd rate (rate of inhibition) |
| 40 μ g 22-hydroxytyingene (control) | 68.12 \pm 3.60 | 38.00 \pm 1.21 |
| 40 μ g 22-hydroxytyingene after 0.10 mM DTNB | 49.56 \pm 3.03 * | 25.45 \pm 1.22 * |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

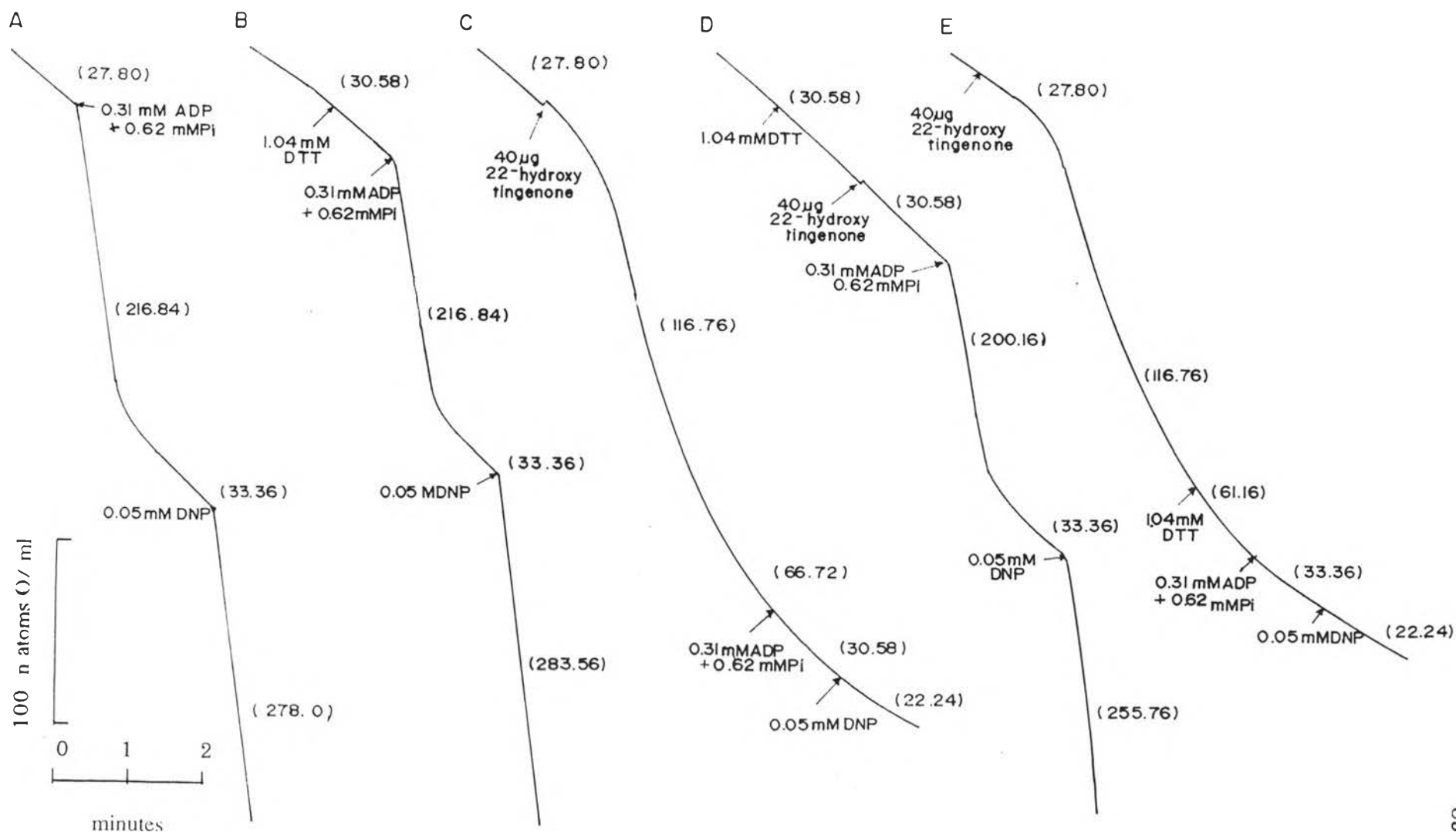
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.90 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.10 mM DTNB และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนความเข้มข้น 47.72 μ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 28 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

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 และไมโทคอนเดรีย 1.93 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, DTT และ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 μM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที



ตารางที่ 11 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of oxygen consumption after 40 μ g 22-hydroxytingenone (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) |
|--|---|
| 40 μ g 22-hydroxytingenone (control) | 68.12 \pm 3.60 |
| 1.04 mM DTT + 40 μ g 22-hydroxytingenone | 16.31 \pm 0.52 * |
| 40 μ g 22-hydroxytingenone + 1.04 mM DTT | 65.76 \pm 5.79 NS |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS = p>0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

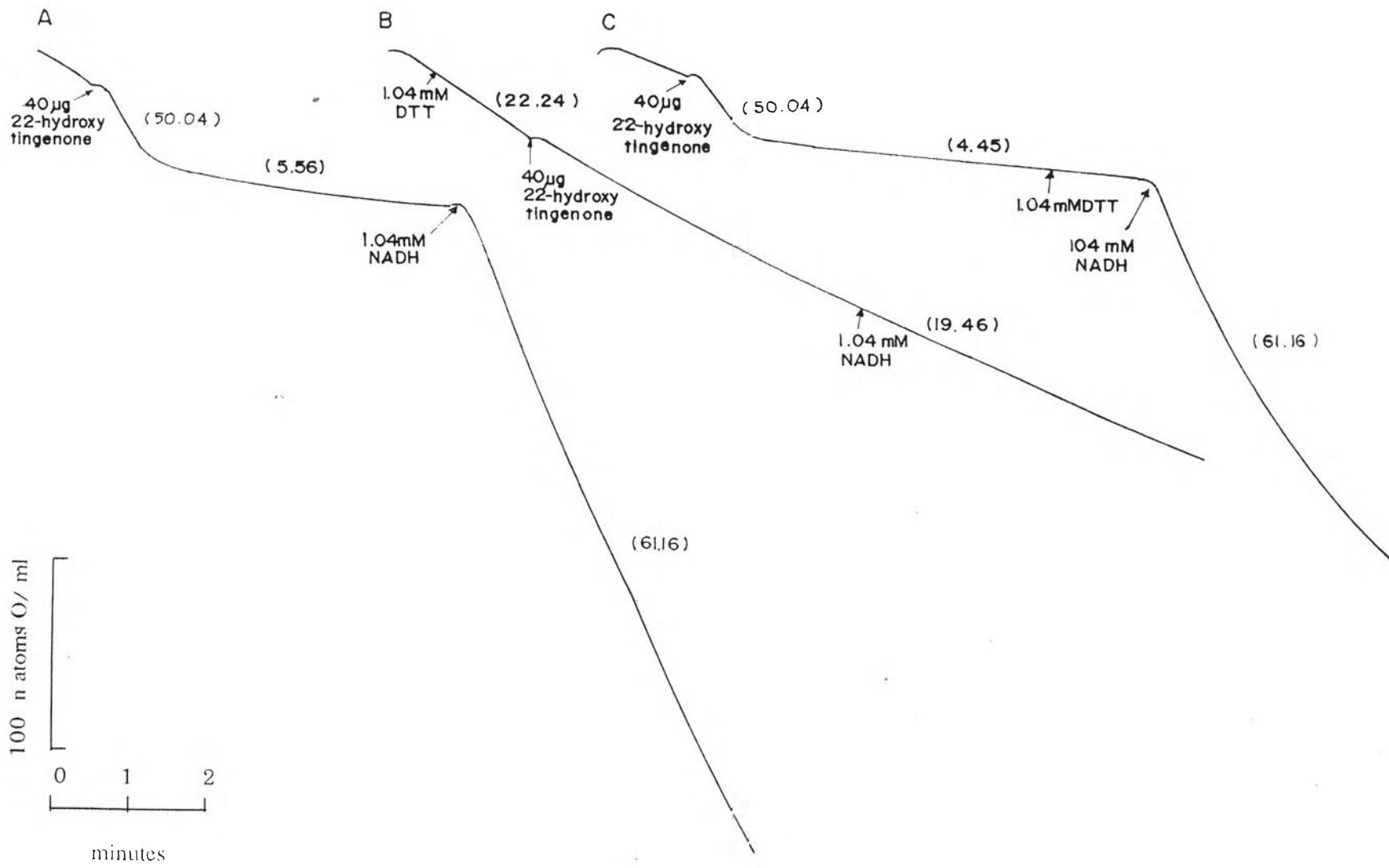
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.90 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 1.04 mM DTT และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนความเข้มข้น 47.72 μ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 29 ผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นให้มีการออกซิไดส์ NADH โดย 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกตั้งแสดงในรูป คือ DTT, 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 μM และ NADH ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที



ตารางที่ 12 ผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นให้มีการออกซิไดซ์ NADH โดย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน

| Experiments | rate of oxygen consumption after 1.04 mM NADH (n atoms O/min/mg protein) (mean ± SE) |
|---|---|
| 40 µg 22-hydroxytingenone (control) | 37.12 ± 1.73 |
| 1.04 mM DTT + 40 µg 22-hydroxytingenone | 8.96 ± 1.56 * |
| 40 µg 22-hydroxytingenone + 1.04 mM DTT | 37.92 ± 1.67 NS |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS = p>0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

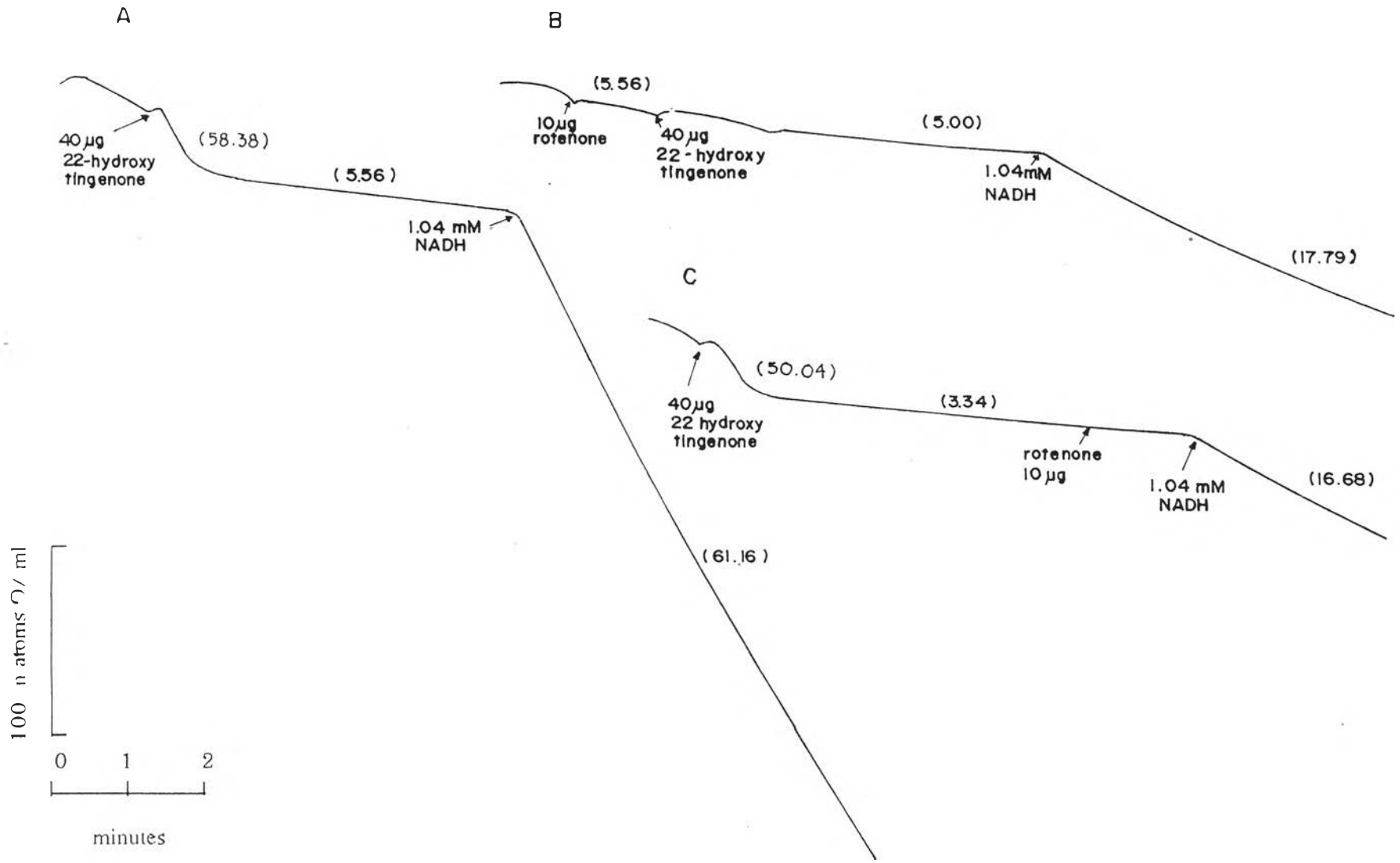
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ DTT, 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 µM และ NADH ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 30 ผลของ rotenone ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นให้มีการออกซิไดซ์ NADH โดย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ rotenone 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ความเข้มข้น 47.72 μM และ NADH ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/มล. /นาที



ตารางที่ 13 ผลของ rotenone ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นให้มีการออกซิไดซ์ NADH โดย 22-ไฮดรอกซีทิงจิโนน

| Experiments | rate of oxygen consumption after 1.04 mM NADH (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) |
|---|---|
| control (40 μ g 22-hydroxytyingene) | 37.12 \pm 1.73 |
| 10 μ g rotenone+40 μ g 22-hydroxytyingene | 9.10 \pm 0.55 * |
| 40 μ g 22-hydroxytyingene + 10 μ g rotenone | 12.51 \pm 2.08 * |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/ มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ rotenone 22-ไฮดรอกซีทิงจิโนน ความเข้มข้น 47.72 μ M และ NADH ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 14 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.30 mM HEPES buffer , 1.74 mM $MgCl_2$, 81.17 mM KCl, 16.78 mM sucrose ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.22 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ดังแสดงในตาราง และ 5.03 mM ATP เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนแล้ว 1 นาทีปริมาตรทั้งหมด 2.98 มล. อุณหภูมิ $37^{\circ}C$

ค่าที่แสดง เป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 14

| Experiments | Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min) (mean \pm SE) |
|--------------------------------|--|
| none (control) | 0.1925 \pm 0.047 |
| 10 μ l DMSO | 0.2000 \pm 0.044 |
| 8 μ g 22-hydroxytingenone | 0.2275 \pm 0.058 |
| 16 μ g 22-hydroxytingenone | 0.2600 \pm 0.072 |
| 24 μ g 22-hydroxytingenone | 0.3475 \pm 0.073 |
| 32 μ g 22-hydroxytingenone | 0.7075 \pm 0.054 * |
| 40 μ g 22-hydroxytingenone | 1.1300 \pm 0.123 * |
| 48 μ g 22-hydroxytingenone | 1.2500 \pm 0.160 * |
| 56 μ g 22-hydroxytingenone | 1.3150 \pm 0.124 * |
| 64 μ g 22-hydroxytingenone | 1.3900 \pm 0.170 * |
| 72 μ g 22-hydroxytingenone | 1.3975 \pm 0.164 * |
| 80 μ g 22-hydroxytingenone | 1.4175 \pm 0.163 * |

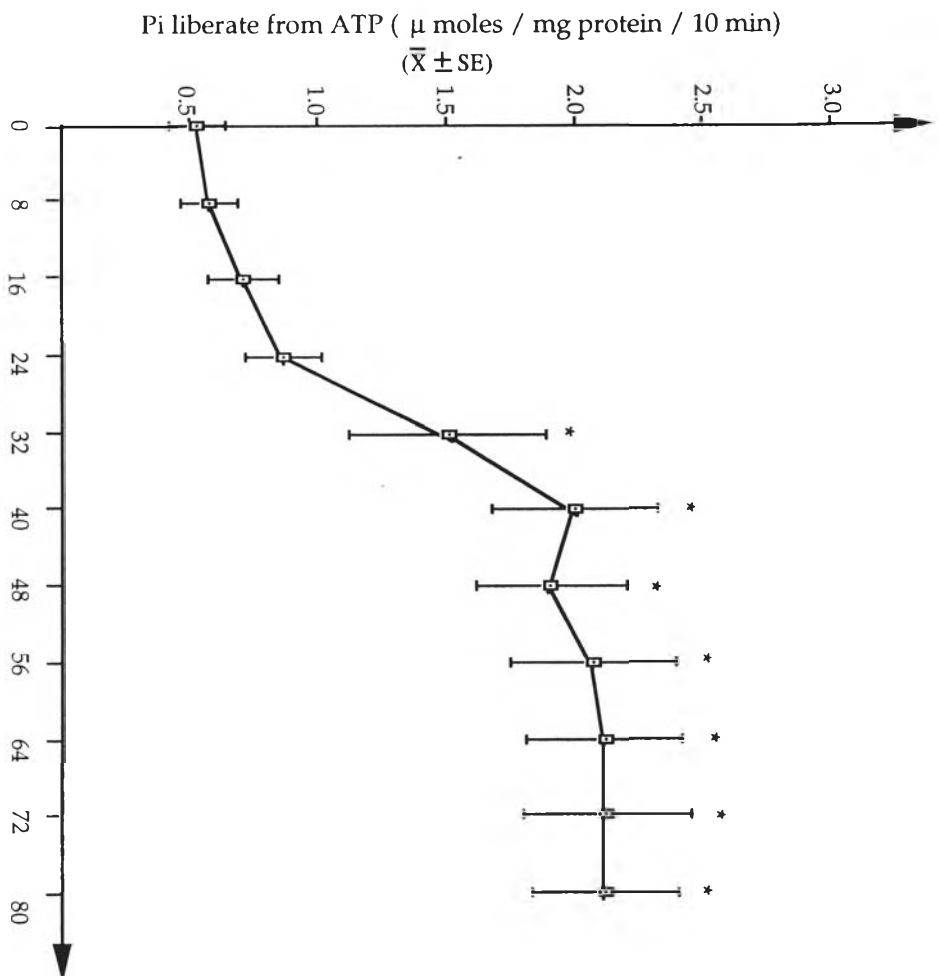
n = 4

* p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 31 Dose-response curve ของผลของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.30 mM HEPES buffer , 1.74 mM $MgCl_2$, 81.17 mM KCl, 16.78 mM sucrose ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.22 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ดังแสดงในรูป และ 5.03 mM ATP เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนแล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.98 มล. อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



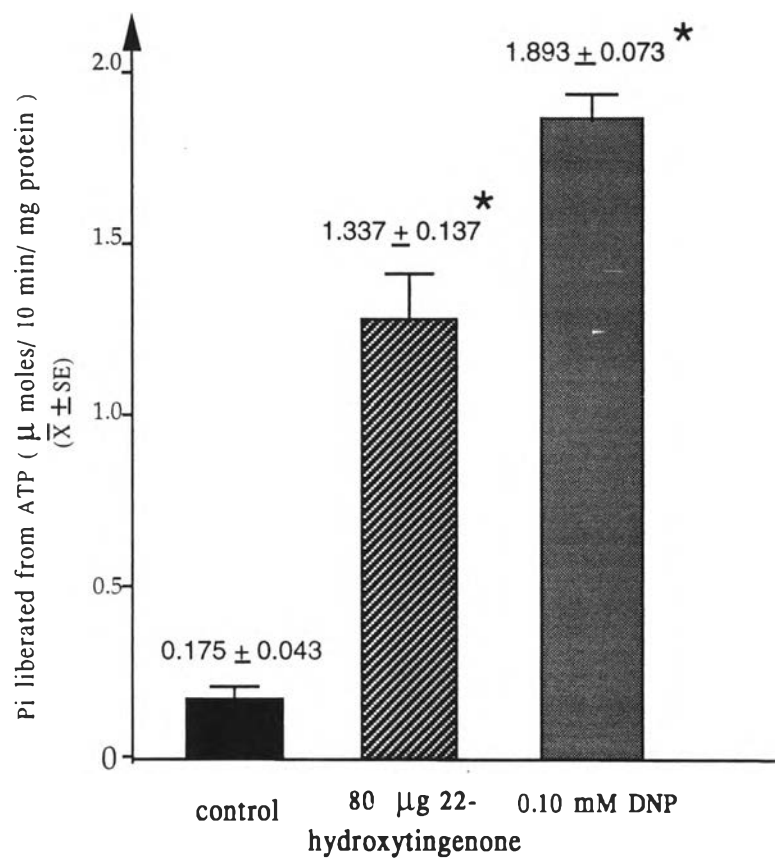
22 - hydroxyingenone (μ g)

* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 32 ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย ระหว่าง 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน กับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.30 mM HEPES buffer , 1.74 mM $MgCl_2$, 81.17 mM KCl, 16.78 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.63 มก. โปรตีน/มล. 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ความเข้มข้น 61.49 μM หรือ 0.10 mM DNP และ 5.03 mM ATP เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนแล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.98 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 15 ผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซี ทิงจีโนนในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.30 mM HEPES buffer , 1.74 mM $MgCl_2$, 81.17 mM KCl, 16.78 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.63 มก. โปรตีน/มล. 22-ไฮดรอกซี ทิงจีโนน ความเข้มข้น 24.60 μM 5.03 mM ATP ปริมาณของ DMSO oligomycin atractyloside และความเข้มข้นของ DNP ดังแสดงไว้ในตาราง เติมตัวยาต่าง ๆ ลงไป preincubate ไมโทคอนเดรียตามลำดับ ดังแสดงในตาราง การเติมตัวยาแต่ละครั้ง เว้นช่วงเวลานาน 1 นาที เติม ATP หลังจากเติมตัวยาอื่น ๆ ครบแล้วเป็นเวลา 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.98 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 15

| Experiments | Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min) (mean \pm SE) |
|--|--|
| none | 0.1675 \pm 0.033 |
| 10 μ l DMSO | 0.1850 \pm 0.050 |
| 32 μ g 22-hydroxytingenone (control) | 0.6950 \pm 0.070 |
| 10 μ g oligomycin + 32 μ g 22-hydroxytingenone | 0.3950 \pm 0.025 * |
| 100 μ g atractyloside + 32 μ g 22-hydroxytingenone | 0.5000 \pm 0.074 NS |
| 0.10 mM DNP (control) | 1.8925 \pm 0.073 |
| 10 μ g oligomycin + 0.10 mM DNP | 0.4550 \pm 0.047 * |
| 100 μ g atractyloside + 0.10 mM DNP | 0.8175 \pm 0.216 * |

n = 4 * p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS = p > 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ตารางที่ 16 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.30 mM HEPES buffer , 1.74 mM $MgCl_2$, 81.17 mM KCl pH 6.8 , 7.2 และ 7.6, 16.78 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.63 มก. โปรตีน/มล. 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ความเข้มข้น 24.60 μM 5.03 mM ATP ปริมาณของ DMSO และความเข้มข้นของ DNP ดังแสดงในตาราง เติมตัวยาด่าง ๆ ลงไป preincubate ไมโทคอนเดรียตามลำดับ ดังแสดงในตาราง การเติมตัวยาดแต่ละครั้ง เว้นช่วงเวลานาน 1 นาที เติม ATP หลังจากเติมตัวยาดอื่น ๆ ครบแล้วเป็นเวลา 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.98 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 16

| Experiments | Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min) (mean \pm SE) |
|--|--|
| none (pH 6.8) | 0.1750 \pm 0.043 NS |
| none (pH 7.2)(control) | 0.1675 \pm 0.033 |
| none (pH 7.6) | 0.1775 \pm 0.042 NS |
| 10 μ l DMSO (pH 6.8) | 0.1825 \pm 0.047 NS |
| 10 μ l DMSO (pH 7.2)(control) | 0.1850 \pm 0.050 |
| 10 μ l DMSO (pH 7.6) | 0.2025 \pm 0.053 NS |
| 32 μ g 22-hydroxytingenone (pH 6.8) | 0.7550 \pm 0.092 NS |
| 32 μ g 22-hydroxytingenone (pH 7.2)(control) | 0.6950 \pm 0.070 |
| 32 μ g 22-hydroxytingenone (pH 7.6) | 0.6875 \pm 0.066 NS |
| 0.10 mM DNP (pH 6.8) | 1.9800 \pm 0.135 NS |
| 0.10 mM DNP (pH 7.2) (control) | 1.8925 \pm 0.073 |
| 0.10 mM DNP (pH 7.6) | 1.7750 \pm 0.063 NS |

n = 4

NS = $p > 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 17 ผลของ DTNB และ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนนใน การกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.30 mM HEPES buffer , 1.74 mM $MgCl_2$, 81.17 mM KCl, 16.78 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.60 มก. โปรตีน/มล. 22-ไฮดรอกซีทีงจีโนน ความเข้มข้น 24.60 μM 5.03 mM ATP ปริมาณของ DMSO และความเข้มข้นของ DTNB และ DTT ดังแสดงในตาราง เติมตัวยาต่าง ๆ ลงไป preincubate ไมโทคอนเดรียตามลำดับ ดังแสดงในตาราง การเติมตัวยาแต่ละครั้ง เว้นช่วงเวลานาน 1 นาที เติม ATP หลังจากเติมตัวยาอื่น ๆ ครบแล้วเป็นเวลา 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.98 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 17

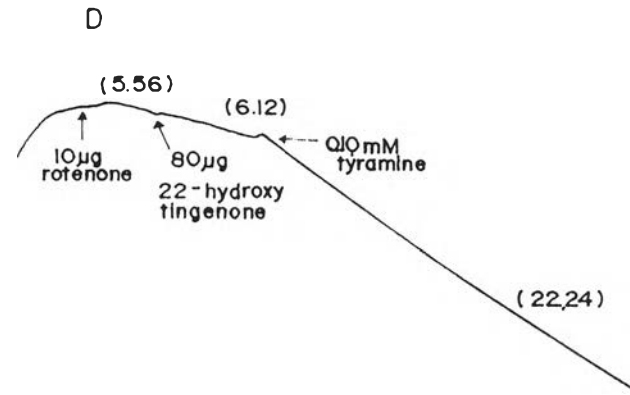
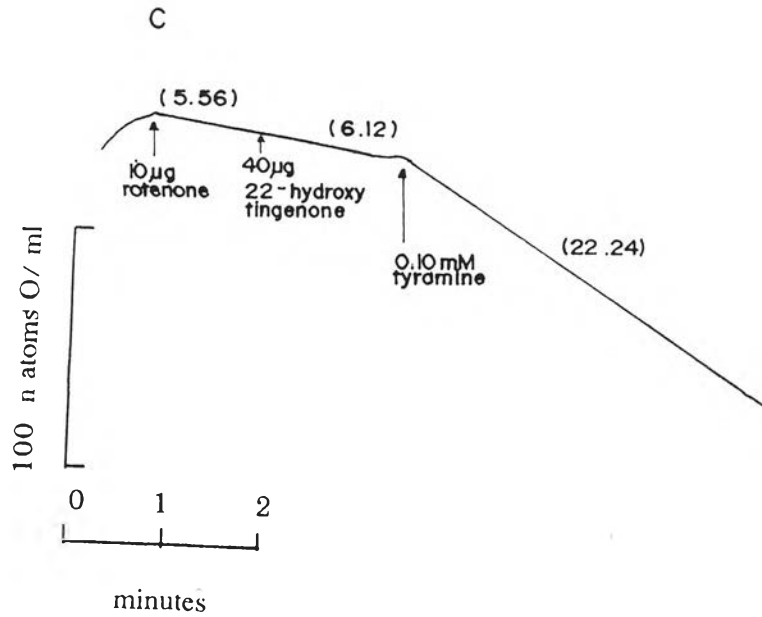
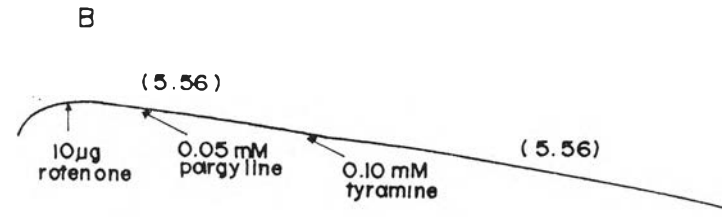
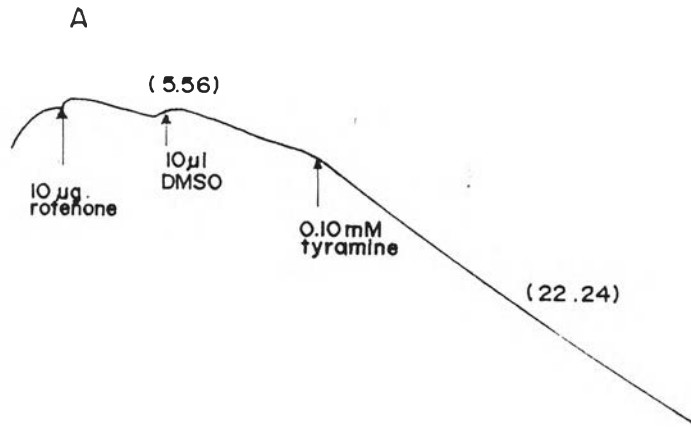
| Experiments | Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min) (mean \pm SE) |
|---|--|
| none | 0.1675 \pm 0.033 |
| 10 μ l DMSO | 0.1850 \pm 0.050 |
| 0.10 mM DTNB | 0.4125 \pm 0.010 |
| 1.01 mM DTT | 0.2400 \pm 0.021 |
| 0.10 mM DTNB + 1.01 mM DTT | 0.3600 \pm 0.031 |
| 32 μ g 22-hydroxytingenone (control) | 0.6950 \pm 0.070 |
| 0.10 mM DTNB + 32 μ g 22-hydroxytingenone | 1.3325 \pm 0.054 * |
| 1.01 mM DTT + 32 μ g 22-hydroxytingenone | 0.3450 \pm 0.051 * |
| 32 μ g 22-hydroxytingenone + 1.01 mM DTT | 0.4150 \pm 0.049 * |
| 0.10 mM DTNB + 1.01 mM DTT + 32 μ g 22-hydroxytingenone | 0.8175 \pm 0.260 |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 33 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.023 M KH_2PO_4 pH 7.2, 13.02 mM sucrose, 10 μg rotenone และไมโทคอนเดรีย 2.01 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูปคือ DMSO tyramine pargyline และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน/นาที/มก. โปรตีน





ตารางที่ 18 ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of oxygen consumption after 0.10 mM tyramine (n atoms O/min/mg protein) (mean \pm SE) |
|-------------------------------|--|
| control | 11.33 \pm 0.18 |
| 40 μ g 22-hydroxytyingene | 10.98 \pm 0.47 NS |
| 80 μ g 22-hydroxytyingene | 10.98 \pm 0.47 NS |
| 0.05 mM pargyline | 3.12 \pm 0.24 * |

n = 4 * p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS = p>0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.023 M KH_2PO_4 , pH 7.2, 13.02 mM sucrose, 10 μ g rotenone และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.96 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูปคือ DMSO, tyramine, pargyline และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง